



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

CELINA CAVALCANTE MUNIZ GOMES

GALECTINA-4: PLASTICIDADE SINÁPTICA, MEMÓRIA E NEUROMODULAÇÃO

Recife
2025

CELINA CAVALCANTE MUNIZ GOMES

GALECTINA-4: PLASTICIDADE SINÁPTICA, MEMÓRIA E NEUROMODULAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestra em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientadora: Michelle Melgarejo da Rosa

Coorientador: Joelson Germano Crispim

Recife

2025

Gomes, Celina Cavalcante Muniz.

Galectina-4: plasticidade sináptica, memória e neuromodulação
/ Celina Cavalcante Muniz Gomes. - Recife, 2025.
138f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica, 2025.

Orientação: Michelle Melgarejo da Rosa.

Inclui referências.

1. Galectina-4; 2. Cérebro; 3. Memória. I. Rosa, Michelle
Melgarejo da. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CELINA CAVALCANTE MUNIZ GOMES

GALECTINA-4: PLASTICIDADE SINÁPTICA, MEMÓRIA E NEUROMODULAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovado em: 18/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Michelle Melgarejo da Rosa (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Michelly Cristiny Pereira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Isvania Maria Serafim Lopes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao apoio e troca de conhecimento com a professora Michelle, que sempre desafia e cativa a mim e a todo o seu grupo, com sua leveza e amor pelas neurociências. Ao grupo de neuro, pelo apoio e parceria. À equipe técnico-laboratorial do NUPIT, pelo suporte e manutenção de estrutura e insumos, que permitiu a realização da maioria dos experimentos de bancada. A FACEPE e CAPES pelo fomento financeiro e incentivo à ciência. À UFPE, instituição que tenho orgulho de ter percorrido toda a minha trajetória acadêmica e cuja permanência em meio a crescente escassez de recursos financeiros, é reflexo de luta por uma educação pública de qualidade, pela democratização da informação de qualidade em ciência, assim como pela conservação da memória coletiva de um passado que se faz vivo através de sabedorias simbólicas cultural, religiosa e histórica. Também agradeço aos meus pais, avós, tias, ao meu cachorro, irmão, familiares, amigas e amigos.

(...) Mas não devemos esquecer que, quando o rádio foi descoberto, ninguém sabia que ele seria útil em hospitais. O trabalho era de ciência pura. E isso é uma prova de que o trabalho científico não deve ser considerado do ponto de vista de sua utilidade direta. Ele deve ser feito por si mesmo, pela beleza da ciência, e então sempre há a chance de que uma descoberta científica possa se tornar, como o rádio, um benefício para a humanidade. Mas a ciência não é rica, não dispõe de meios importantes e geralmente não recebe reconhecimento antes que sua utilidade material seja comprovada. As fábricas produzem muitos gramas de rádio todos os anos, mas os laboratórios têm quantidades muito pequenas. O mesmo se aplica ao meu laboratório, e sou muito grata às mulheres Americanas que desejam que eu tenha mais rádio e me dêem a oportunidade de trabalhar mais com ele. A história científica do rádio é bela. As propriedades dos raios foram estudadas minuciosamente. Sabemos que partículas são expelidas do rádio a uma velocidade muito alta, próxima à da luz. Sabemos que os átomos de rádio são destruídos pela expulsão dessas partículas, algumas das quais são átomos de hélio. E, dessa forma, provou-se que os elementos radioativos estão em constante desintegração e que, no final, produzem elementos comuns, principalmente hélio e chumbo. Esta é, como se vê, uma teoria da transformação de átomos que não são estáveis, como se acreditava antes, mas podem sofrer mudanças espontâneas. O rádio não é o único a possuir essas propriedades. Muitos outros radioelementos já são conhecidos: o polônio, o mesotório, o rádiotório e o actínio. Também conhecemos gases radioativos, chamados emanções. Há uma grande variedade de substâncias e efeitos na radioatividade. Sempre há um vasto campo para experimentação e espero que possamos ter algum progresso significativo nos próximos anos. É meu sincero desejo que alguns de vocês continuem este trabalho científico e mantenham em suas ambições a determinação de fazer uma contribuição permanente para a ciência (...)

(Discurso de Madame Curie no Vassar College, 14 de maio de 1921, publicado em "*The Discovery of Radium*")

RESUMO

Distúrbios neurológicos (DNs) são condições crônicas que comprometem a plasticidade sináptica, a memória e o aprendizado. Nas últimas décadas, evidências têm apontado o envolvimento das galectinas expressas no sistema nervoso central em processos de neuromodulação e neuroinflamação associados aos DNs. Apesar dos avanços, o papel da Galectina-4 (Gal-4) no cérebro permanece pouco explorado, especialmente em relação à plasticidade sináptica, memória e aprendizado. Diante disso, este estudo investigou a contribuição da Gal-4 na plasticidade sináptica e na consolidação da memória, com ênfase em sua interação com vias de sinalização gabaérgicas, dopaminérgicas e glutamatérgicas. Análises *in silico* utilizando o ClusPro, indicaram energia de ligação favorável de acordo com o parâmetro de menor pontuação ponderada de energia e eficiência de acoplamento da Gal-4 à subunidade GluN2B de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (*Weighted Score* = -1029,5) e aos receptores dopaminérgicos D2 (*Weighted Score* = -818,3). Complementarmente, experimentos de imunocitoquímica em células de neuroblastoma humano mostraram aumento significativo da expressão endógena de Gal-4 após o bloqueio de vias glutamatérgicas ($Z = 7,047$; $Z = 5,210$; $p < 0,0001$) e dopaminérgicas ($Z = 8,404$; $Z = 6,400$; ($p < 0,0001$), em comparação ao grupo controle e ao grupo tratado com muscimol, respectivamente. Além disso, o bloqueio da Gal-4 endógena reduziu os níveis de pCREB em células de neuroblastoma submetidas à atividade gabaérgica, quando comparado ao grupo com excitação neuronal sem bloqueio ($Z = 5,455$; $p < 0,0001$), sugerindo uma possível modulação da Gal-4 sobre vias de sinalização relacionadas à atividade neuronal *in vitro*. Por outro lado, a inibição de Gal-4 não alterou a expressão gênica de receptores dopaminérgicos, glutamatérgicos, pCREB, nem de genes associados à plasticidade sináptica. Em modelo *in vivo*, o bloqueio intra-hipocampal de Gal-4 não impactou a memória de medo na tarefa de condicionamento contextual. Em conjunto, os dados indicam, de forma inédita, que a Gal-4 endógena pode exercer um papel neuromodulador na plasticidade sináptica por meio de mecanismos pós-transcrpcionais homeostáticos, envolvendo as vias NMDA/pCREB e D2/pCREB.

Palavras-chave: Galectina-4; cérebro; memória; neuromodulação.

ABSTRACT

Neurological disorders (NDs) are chronic conditions that impair synaptic plasticity, memory, and learning. In recent decades, evidence has highlighted the involvement of galectins expressed in the central nervous system in neuromodulation and neuroinflammation processes associated with NDs. Despite advances, the role of Galectin-4 (Gal-4) in the brain remains poorly explored, especially in relation to synaptic plasticity, memory, and learning. Therefore, this study investigated the contribution of Gal-4 to synaptic plasticity and memory consolidation, with an emphasis on its interaction with GABAergic, dopaminergic, and glutamatergic signaling pathways. In silico analyses using ClusPro indicated favorable binding energy of Gal-4 to the GluN2B subunit of NMDA-type glutamate receptors (Weighted Score = -1029.5) and to dopamine D2 receptors (Weighted Score = -818.3). Complementarily, immunocytochemistry experiments in human neuroblastoma cells showed a significant increase in endogenous Gal-4 expression after blockade of glutamatergic ($Z = 7.047$; $Z = 5.210$; $p < 0.0001$) and dopaminergic ($Z = 8.404$; $Z = 6.400$; $p < 0.0001$) pathways, compared to the control group and the muscimol-treated group, respectively. Furthermore, blockade of endogenous Gal-4 reduced pCREB levels in neuroblastoma cells subjected to GABAergic activity, when compared to the group with neuronal excitation without blockade ($Z = 5.455$; $p < 0.0001$), suggesting a possible modulation of Gal-4 on signaling pathways related to neuronal activity in vitro. On the other hand, inhibition of Gal-4 did not alter the gene expression of dopaminergic receptors, glutamatergic receptors, pCREB, or genes associated with synaptic plasticity. In an in vivo model, intrahippocampal Gal-4 blockade did not impact fear memory in the contextual conditioning task. Taken together, the data indicate, for the first time, that endogenous Gal-4 may play a neuromodulatory role in synaptic plasticity through homeostatic post-transcriptional mechanisms involving the NMDA/pCREB and D2/pCREB pathways.

Keywords: Galectin-4; brain; memory; neuromodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Tipos, locais de atuação e funções das galectinas	19
Figura 2 –	Galectinas são reguladoras únicas da imunidade do hospedeiro	22
Figura 3 –	Estruturas cerebrais, tipos/estruturas celulares e moléculas associadas às galectinas	25
Figura 4 –	Estruturas cristalinas dos domínios Galectina-4N e Galectina-4C	26
Figura 5 –	Modelo do comprimento total da Galectina-4	28
Figura 6 –	Representação de interações entre os domínios galectina-N e galectina-C, mediadas por ligações de hidrogênio	29
Figura 7 –	Ilustração de potenciais papéis da expressão da Gal-4 durante a formação da bainha de mielina e após dano neuronal	32
Figura 8 –	Célula de Purkinje extraída do cerebelo humano desenhada por Cajal	33
Figura 9 –	Esquema de principais eventos moleculares na sinalização sináptica na modulação da consolidação da memória	38
Figura 10 –	Circuito de recompensa ATV-NAc	40
Figura 11 –	Mecanismos moleculares por trás do Transtorno de Estresse Pós-traumático	44
Figura 12 –	Visualização esquemática da estrutura em 3D da interação mais favorável entre a estrutura 4XZP e a subunidade 4TLL gerado pelo PDBsum, no modelo de energia balanceada	63
Figura 13 –	Gráfico Ramachandran da interação entre as estruturas 4XZP e 4TLL	64
Figura 14 –	Esquema visual dos tipos de cadeias e de ligações na interação entre a subunidade 4XZP da Gal-4 e a subunidade 4TLL do receptor glutamatérgico do tipo NMDA	66
Figura 15 –	Diagrama esquemático visual de interações entre a estrutura 4XZP e a subunidade 4TLL	67

Figura 16 –	Esquema visual das interações entre os resíduos aminoácidos das cadeias A e D	68
Figura 17 –	Visualização esquemática da estrutura em 3D da interação mais favorável entre a estrutura 4XZP e a subunidade 6VMS gerado pelo PDBsum, no modelo de energia balanceada	72
Figura 18 –	Gráfico Ramachandran da interação entre as estruturas 4XZP e 6VMS	73
Figura 19 –	Esquema visual dos tipos de cadeias e de ligações na interação entre a subunidade 4XZP da Gal-4 e a estrutura 6VMS do receptor dopaminérgico D2	75
Figura 20 –	Diagrama esquemático visual de interações entre a estrutura 4XZP e a cadeia P da estrutura 6VMS	76
Figura 21 –	Esquema visual das interações entre os resíduos aminoácidos das cadeias A e P(A)	77
Figura 22 –	Diagrama esquemático visual de interações entre a estrutura 4XZP e a cadeia B da estrutura 6VMS	78
Figura 23 –	Esquema visual das interações entre os resíduos aminoácidos das cadeias A e B	79
Figura 24 –	Expressão endógena de Gal-4 em culturas de neuroblastoma humano submetidas a diferentes tratamentos farmacológicos	81
Figura 25 –	A expressão de pCREB é influenciada por alterações nos níveis endógenos de Gal-4 em cultura de neuroblastoma humano	83
Figura 26 –	Expressão relativa do CREB, ARC, CFOS, subunidade GluN2B de receptor glutamatérgico do tipo NMDA e receptor dopaminérgico D2	85
Figura 27 –	Teste de Medo Condicionado Contextual e Teste de Campo Aberto	86

Figura 28 –	Teste de Labirinto em Cruz Elevado	88
Figura 29 –	Tela do <i>Software</i> G*Power com o cálculo do tamanho da amostra no experimento de ICC com alvo molecular Gal-4	150
Figura 30 –	Tela do <i>Software</i> G*Power com o cálculo do tamanho da amostra no experimento de ICC com alvo molecular pCREB	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização de proteínas selecionadas no PDB	60
Tabela 2 –	Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-4TLL, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia balanceada	61
Tabela 3 –	Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-4TLL, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia eletrostática favorecida	62
Tabela 4 –	Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-4TLL, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia hidrofóbica favorecida	62
Tabela 5 –	Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-4TLL, de acordo com pontuações ponderadas no modelo <i>Van der Waals</i> + eletrostática	62
Tabela 6 –	Dados estatísticos do gráfico de Ramachandram através do PROCHECK	64
Tabela 7 –	Fatores-G do gráfico de Ramachandram através do PROCHECK	65
Tabela 8 –	Análise estatística da predição da interação entre as cadeias A e D	67
Tabela 9 –	Interações entre aminoácidos das cadeias A e D e principais propriedades físico-químicas	68
Tabela 10 –	Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-6VMS, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia balanceada	70
Tabela 11 –	Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-6VMS, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia eletrostática favorecida	70
Tabela 12 –	Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-6VMS, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia hidrofóbica favorecida	71

Tabela 13 – Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-6VMS, de acordo com pontuações ponderadas no modelo <i>Van der Waals</i> + eletrostática	71
Tabela 14 – Fatores-G do gráfico de Ramachandram através do PROCHECK	73
Tabela 15 – Fatores-G do gráfico de Ramachandram através do PROCHECK	74
Tabela 16 – Análise estatística da predição das cadeias A e P (A)	76
Tabela 17 – Interações entre aminoácidos da cadeia A da estrutura e P(A) e principais propriedades físico-químicas	77
Tabela 18 – Análise estatística da predição das cadeias A e B	79
Tabela 19 – Estatística Descritiva fornecida pelo Graphpad Prism do experimento de ICC com alvo molecular Gal-4	149
Tabela 20 – Estatística Descritiva fornecida pelo Graphpad Prism do experimento de ICC com alvo molecular pCREB	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
aa	Aminoácido
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico, do inglês <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico, do inglês <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
BABP	Ácido Biliar Ileal Humano
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, do inglês <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSA	Proteína Bovina Sérica
CaMKII	Calmodulina quinase II
CBD	Canabidiol
CD	Cluster de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CPF	Córtex Pré-Frontal
CPFm	Córtex Pré-Frontal medial
CRD	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP, do inglês <i>cAMP-response element binding protein</i>
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DA	Doença de Alzheimer
DNs	Distúrbios Neurológicos
DP	Doença de Parkinson
DPM	Dopamina
EC	Estímulo Condicionado
EI	Estímulo Incondicionado
EP	Epinefrina
Gal	Galectina
GABA	Ácido aminobutírico, do inglês <i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>
CRH	Hormônio liberador de corticotropina, do inglês <i>Corticotropin-Releasing Hormone</i>

GH	Hormônio do crescimento, do inglês <i>Growth Hormone</i>
GLU	Glutamato
GPX	Glutathione peroxidase
HMGB-1	Grupo box-1 de alta mobilidade
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HPC	Hipocampo
I-BABP	Proteína de ligação ao ácido biliar ileal humano
IL	Interleucina
IFN- α	Interferon- α
ISRSs	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
IR	Índice de Imunoreatividade
JAK-STAT	Ativador da Transcrição e Transdutor de Sinal Janus Quinase
KYNA	Ácido quinurênico
LTP	Potencial de longa duração, do inglês <i>Long Term Potentiation</i>
LTD	Depressão de longa duração, do inglês <i>Long Term Depression</i>
MAPK/ERK	Quinase de proteína ativada por mitógeno/Quinase regulada por sinal extracelular, do inglês <i>Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
MAPS	Associação Multidisciplinar para Estudos Psicodélicos
MDMA	3,4-Metilenodioximetanfetamina
MEC	Matriz Extracelular
NE	Norepinefrina
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
NMDA	N-metil-D-aspartato
OLGs	Oligodendróцитos
OPC	Células progenitoras de oligodendróцитos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Proteína C-Reativa
PDB	Banco de Dados de Proteínas, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
PFA	Paraformaldeído
PKA	Proteína Quinase A, do inglês <i>Protein Kinase A</i>
PKC	Proteína Quinase C
qPCR	Reação da Cadeia de Polimerase em Tempo Real

QUIN	Ácido quinolínico
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Teste de Campo Aberto
TCLE	Teste do Labirinto em Cruz Elevado
TEPT	Transtorno de Estresse Pós-Traumático
TGF- β	Fator- β de Crescimento Transformador
TLR	Receptores do Tipo Toll
TMCC	Teste de Medo Condicionado Contextual
TMs	Transtornos Mentais
TNF- α	Fator- α de Necrose Tumoral
TREM2	Receptor de gatilho expresso em células mieloides 2
TRP	Triptofano
RDD	Receptores dopaminérgicos D2
RNMDA	Receptores glutamatérgicos do tipo NMDA
RMSD	Desvio Quadrático Médio
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
ROIS	Região de interesse, do inglês <i>Region of Interest</i>
RQ	Quantificação Relativa
SAM	Simpático-adrenomedular
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
sST2	Supressão solúvel da tumorigênese-2
VR	Valor de Referência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Galectinas	16
3.1.1	<i>Funções das galectinas</i>	20
3.1.2	<i>Galectinas -1, -3, -4, -8 e -9 na neuroinflamação em distúrbios neurológicos</i>	22
3.1.3	<i>Galectina-4</i>	26
3.1.4	<i>Galectina-4 no SNC</i>	30
3.2	Plasticidade sináptica, memória e aprendizado	33
3.2.1	<i>Sinalização molecular envolvida plasticidade sináptica e consolidação de memórias</i>	35
3.2.2	<i>Circuitos-chave na plasticidade sináptica e plasticidade sináptica homeostática</i>	39
3.3	Transtorno de Estresse Pós-Traumático e memória traumática	41
3.3.1	<i>Desafios da terapia farmacológica do TEPT</i>	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Modelo <i>in silico</i>	46
4.1.1	<i>Tratamento das estruturas 4XZP, 4TLL e 6VMS</i>	46
4.1.2	<i>Docking molecular das estruturas 4XZP-4TLL e 4XZP-6VMS</i>	47
4.1.3	<i>Análise da qualidade estereoquímica do docking molecular das estruturas 4XZP-4TLL e 4XZP-6VMS</i>	48
4.2	Modelo <i>in vitro</i>	48
4.2.1	<i>Cultura de neuroblastoma</i>	48
4.2.2	<i>Drogas administradas</i>	49
4.2.3	<i>Design Experimental</i>	50
4.2.4	<i>Imunocitoquímica (ICC)</i>	51
4.2.5	<i>Isolamento de RNA e síntese do cDNA</i>	54

4.3	Modelo <i>in vivo</i>	55
4.3.1	<i>Animais</i>	55
4.3.2	<i>Cirurgia para implante de cânulas intra-hipocampal</i>	56
4.3.3	<i>Teste de medo condicionado contextual (TMCC)</i>	57
4.3.4	<i>Teste de Campo Aberto (TCA)</i>	58
4.3.5	<i>Teste de Labirinto em Cruz Elevado (TLCE)</i>	58
4.4	Análise estatística	59
5	RESULTADOS	59
5.1	Predição de afinidade da Galectina-4 pelo receptor glutamatérgico do tipo NMDA e pelo receptor dopaminérgico D2	59
5.2	Influência de Gal-4 em vias de sinalização relacionadas à homeostase, plasticidade sináptica e neuromodulação	80
5.3	Níveis endógenos de Gal-4 influenciam a expressão do fator de transcrição pCREB em cultura de neuroblastoma humano	82
5.4	O bloqueio da Gal-4 endógeno não altera a expressão de genes como CREB, ARC, CFOS, receptores glutamatérgicos GLUN2B e receptor dopaminérgico D2	84
5.5	O bloqueio endógeno da Gal-4 intra-hipocampal não altera a resposta de medo dos animais, não causa fenótipos comportamentais associados a ansiedade e não altera a função locomotora	85
6	DISCUSSÃO	90
7	CONCLUSÃO	95
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	96
9	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

Mais de 3 bilhões de pessoas no mundo convivem com Distúrbios Neurológicos (DNs)¹, condições incapacitantes que afetam memória, aprendizado e cognição (Steinmetz et al., 2024). O aumento crescente da carga global por DNs, tem sido impulsionado por fatores como envelhecimento populacional e alto crescimento demográfico, principalmente em países de baixa e média renda (Feigin et al., 2020). Esses distúrbios são heterogêneos e multifatoriais, resultantes da interação entre fatores genéticos, epigenéticos, biológicos, psicossociais e ambientais que afetam o funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Periférico (SNP) (Cannon e Greenamyre, 2011; Grezenko et al., 2023; Aminorroaya e Aboyans, 2025).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo de estudos sobre a relação bidirecional e de alta comorbidade entre DNs e Transtornos Mentais (TMs)², muitas vezes sub tratados e subnotificados (Hesdorffer, 2016; Erlangsen et al., 2020; Gibbs et al., 2018; Giambarberi e Munger Clary, 2022). Tal interação pode aumentar a gravidade dos sintomas, o que exige abordagens terapêuticas integradas e personalizadas.

O diagnóstico precoce e o manejo terapêutico adequado dos DNs são desafiados pela progressiva, e muitas vezes silenciosa, disfunção de áreas cerebrais associadas à cognição, memória e aprendizado (Perl, Olanow e Calne, 1998). Há uma intrincada rede de neuromodulação envolvida nessas patologias, que aumenta a complexidade terapêutica (Altunkaynak et al., 2017). Apesar da crescente demanda, os avanços no desenvolvimento de terapias eficazes ainda ocorrem de forma lenta, em parte devido à limitada compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes a essas condições (Feigin et al., 2020). A isso somam-se o acesso desigual a serviços de saúde e tratamentos farmacológicos que podem gerar não ¹aderência ao tratamento (Mills et al., 2014; Bahrani et al., 2016;

¹¹ Distúrbios Neurológicos (DNs) são condições que afetam progressivamente funções cognitivas e motoras do Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Periférico.

² Transtornos Mentais (TMs) são desordens que afetam o processamento de emoções, de humor e de comportamento. Alguns autores consideram que elas são um subgrupo de DNs, outros diferenciam para analisar a comorbidade com outros DNs.

Feigin et al., 2020; Jiang et al., 2023; Junaid Farrukh et al., 2021; Dabilgou et al., 2024).

Nesse contexto, é necessário aprofundar o conhecimento sobre as bases estruturais e funcionais que sustentam a regulação cerebral da memória e do aprendizado — processos chave na fisiopatologia de DNs. Entre os alvos de crescente interesse estão as galectinas — uma família de proteínas ligantes de carboidratos que participam de processos fundamentais como sinalização celular, inflamação e resposta imune inata e adaptativa em resposta a patógenos e regulação de mecanismos de reparo celular (Kruk et al., 2023; Liu e Stowell et al., 2023; Galdino, 2021; Silva, 2024; Jacob e Gorek, 2024).

No SNC, as galectinas -1, -3, -4, -8 e -9 estão envolvidas em processos neuroinflamatórios e de neuromodulação, e vêm sendo associadas à fisiopatologia de alguns DNs (Liu, Yang e Hsu et al., 2012; Chen et al., 2014; Díez-Revuelta et al., 2017; da Rosa et al., 2021; Ferreira, 2022; Brocca et al., 2022; Gomes et al., 2024). No entanto, a Galectina-4 (Gal-4) permanece pouco explorada na literatura científica (Rustiguel et al., 2016). A Gal-4 é expressa nos oligodendrócitos e tem sido associada à formação e manutenção da bainha de mielina, especialmente na fase inicial do desenvolvimento do SNC (da Rosa et al., 2021; Peixoto e da Rosa, 2025). No entanto, ainda não há estudos que relacionem a Gal-4, plasticidade sináptica e memória.

Assim, o presente estudo tem como objetivo investigar a atuação da Gal-4 no SNC, e ampliar a compreensão sobre sua função na excitação e inibição celular via sinalização gabaérgica, dopaminérgica e glutamatérgica – processos neurobiológicos essenciais na plasticidade sináptica, memória e aprendizado. A elucidação do papel dessa proteína poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas à modulação cognitiva em distúrbios que afetam a memória e aprendizagem.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Investigar o envolvimento de Gal-4 em processos relacionados à plasticidade sináptica, memória e aprendizado e a relação de Gal-4 com vias dopaminérgicas, glutamatérgicas e gabaérgicas.

2.2 Objetivos Específicos

-Analisar por docking molecular a associação entre Gal-4 e receptores glutamatérgicos e dopaminérgicos;

-Quantificar a expressão endógena de Gal-4 em cultura de neuroblastoma pelas técnicas de Imunocitoquímica (ICC) e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR);

-Analisar a influência das vias glutamatérgicas e dopaminérgicas na expressão endógena de Gal-4 em cultura de neuroblastoma, pela técnica de ICC;

-Analisar se o bloqueio de Gal-4 endógeno influencia a atividade de fosfo-CREB (pCREB) pela técnica de ICC;

-Analisar o nível de expressão de genes codificadores de *Arc*, *C-Fos*, receptor glutamatérgico NMDA e receptor dopaminérgico do tipo D2, com e sem o bloqueio da atividade de Gal-4 endógena pela técnica de qPCR;

-Analisar se a administração intra-hipocampal de anticorpo anti-Gal-4 (0,5µg/µL) pós-treino na tarefa de medo condicionado contextual altera a consolidação de memória contextual aversiva de ratos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Galectinas

A extração e purificação de galectinas para investigação de sua estrutura e função representaram um grande desafio nos estudos iniciais, principalmente devido

à necessidade de controle de fatores-chave na regulação de sua atividade biológica (Kamili et al., 2016; Barondes et al., 2008). As galectinas foram descritas pela primeira vez em 1975 como proteínas pertencentes à família das lectinas capazes de reconhecer carboidratos, em um estudo pioneiro liderado por Vivian Teichberg e colaboradores. Inicialmente denominadas “electrolectinas”, essas proteínas foram isoladas de órgãos da enguia elétrica *Electrophorus electricus* (Teichberg et al., 1975).

Observou-se a capacidade da electrolectina de aglutinar eritrócitos de coelhos tratados com tripsina, enzima responsável por remover resíduos de ácido siálico nas extremidades terminais de cadeias de polissacarídeos, permitindo a ligação dessas estruturas a outras moléculas (Teichberg et al., 1975). Essa ligação foi inibida por dissacarídeos contendo resíduos β -galactosídeos em terminais não redutores, o que sugeriu a capacidade da electrolectina de formar interações não covalentes e, portanto, altamente reversíveis (Teichberg et al., 1975). Também observou-se que sua especificidade era voltada a sacarídeos com terminais não redutores de D-galactose em configuração β , enquanto tal afinidade não foi evidenciada em oligossacarídeos contendo resíduos α -D-galactosil (Teichberg et al., 1975).

A constatação de que a presença de um agente redutor no tampão era essencial para manter a atividade de aglutinação tanto do homogeneizado quanto da proteína purificada foi uma das principais razões para o insucesso na identificação das galectinas em trabalhos anteriores (Barondes et al., 2008). Isso ilustra as limitações na reprodutibilidade de protocolos e a importância de se considerar requisitos intrínsecos às galectinas (Kamili et al., 2016).

Durante muito tempo, essas proteínas foram denominadas “lectinas do tipo S”, em referência à sua dependência de grupamentos tiois reduzidos, como a sulfidrila — característica replicada em diversos estudos (Teichberg et al., 1975; Yang et al., 2001; Lahm et al., 2004; Nangia-Makker et al., 2002). No entanto, esse termo foi posteriormente abandonado, à medida que novas galectinas foram identificadas com atividade independente de agentes redutores durante o isolamento (Barondes et al., 2008).

Um maior controle da influência de fatores que desafiam a extração e purificação das galectinas, permitiu consolidar sua caracterização estrutural e suas funções têm sido investigadas. Hoje é possível compreender que as galectinas são proteínas endógenas evolutivamente conservadas cuja seleção natural moldou a

hierarquia e a redundância parcial de elementos moleculares e atômicos que compõem seus dobramentos tridimensionais (Pandini et al., 2010; Vasta, 2012). As galectinas estão presentes em organismos invertebrados e vertebrados, como esponjas, nematoides, fungos, plantas e mamíferos (Vasta, 2012; Modenutti et al., 2019). Ao se ligarem a glicanos contendo resíduos β -galactosídeos, as galectinas regulam eventos biológicos em diversos processos fisiológicos e patológicos, por meio da modulação de sinalização intra e extracelulares (Figura 1).

Essa capacidade de ligação a glicanos é conferida pela presença do Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD, do inglês Carbohydrate Recognition Domain), estruturas com homologia primária que contêm de 130 a 140 aminoácidos (Hirabayashi et al., 2002; Cummings et al., 2022). Cada CRD é composto por duas folhas β antiparalelas, organizadas em um arranjo do tipo sanduíche- β , que assume uma forma de “mão fechada” (Thijssen, Rabinovich e Griffioen, 2013; Rustiguel et al., 2016; Modenutti et al., 2019). Esse arranjo possibilita o reconhecimento e a ligação a carboidratos.

As galectinas são nomeadas de acordo com sua ordem de descoberta e, até o momento, foram identificados 15 subtipos expressos endogenamente em mamíferos (Figura 1). Elas podem ser classificadas em três grupos com base na estrutura e quantidade de CRDs:

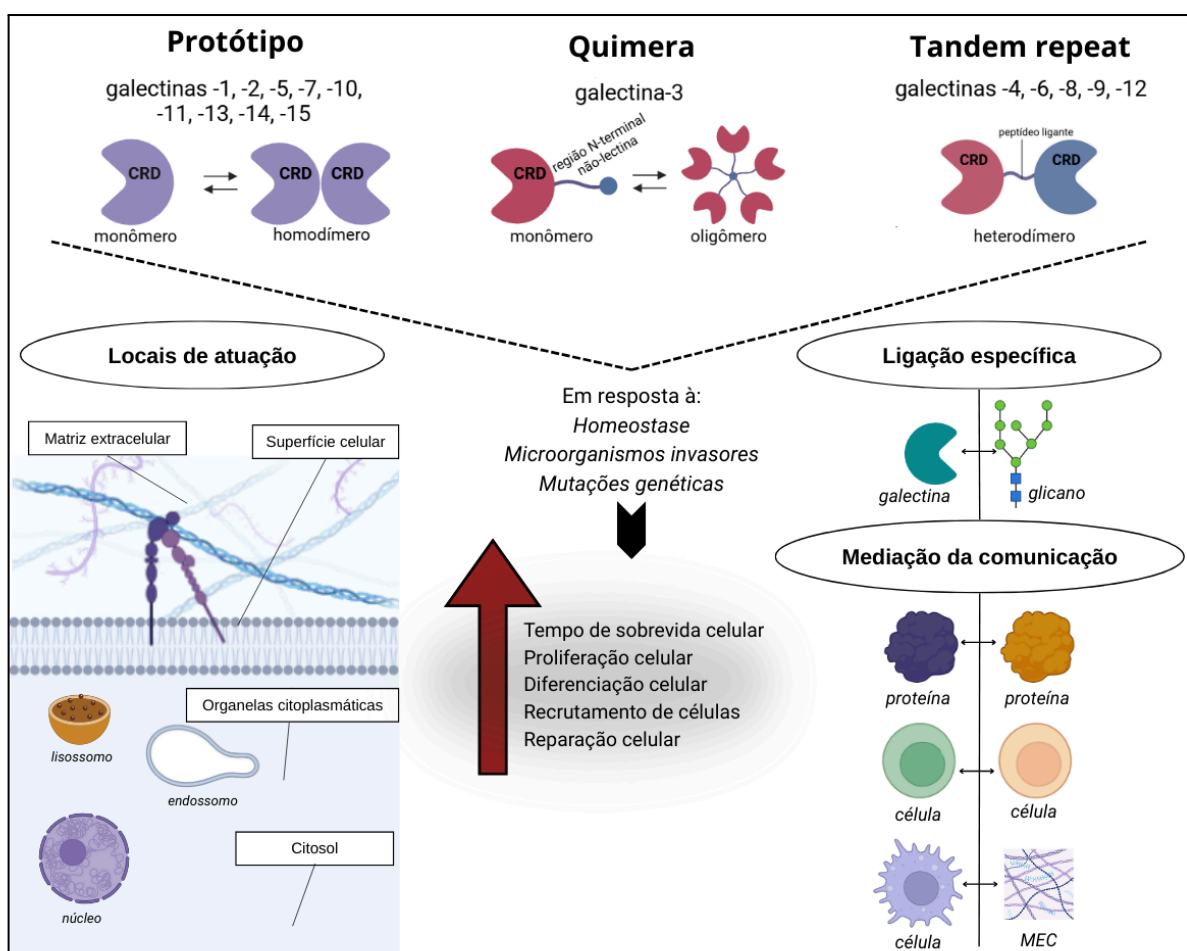
- a) Protótipos – apresentam um único CRD em sua cadeia polipeptídica e podem formar dímeros não covalentes, que variam quanto à extensão da dimerização no estado estacionário (galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -16);
- b) Quiméricas – possuem um CRD ligado a uma região N-terminal não lectina, capaz de formar oligômeros;
- c) *Tandem-repeat* – apresentam dois CRDs distintos numa única cadeia polipeptídica, interligados por um peptídeo ligante funcional (galectinas -4, -6, -8, -9 e -12) (Yang, Rabinovich e Liu, 2008; Vasta, 2012; Rustiguel et al., 2016).

Apesar de a maioria das galectinas apresentarem afinidade por resíduos β -galactosídeos, um estudo recente demonstrou que a galectina-13 não exibe essa atividade e forma dímeros por meio de pontes dissulfeto (Su et al., 2018).

As galectinas são sintetizadas no citosol e secretadas por uma via não clássica para o espaço extracelular apical, de onde são posteriormente internalizadas em compartimentos endossomais e transportadas de volta até a rede trans-Golgi (Hughes, 1999; Nickel, 2005; Bay et al., 2014).

Na interação galectina-glicano, essas proteínas se ligam a uma variedade de glicoconjugados à peptídeos, proteínas ou lipídios — modificações pós-traducionais altamente reguladas por diferentes estímulos (Rabinovich, 1999; Blidner et al., 2015). Nessa interação, as galectinas podem atuar como receptores na superfície celular que detectam e respondem sinais (Rabinovich, 1999; Blidner et al., 2015). A expressão e a distribuição subcelular das galectinas são sensíveis a estímulos infecciosos, inflamatórios, de diferenciação celular e à regulação por genes supressores tumorais (Rabinovich, 1999). As galectinas podem ser encontradas na matriz extracelular (MEC), na membrana plasmática, nas organelas citoplasmáticas, no citosol e no núcleo (Figura 1). A avidéz dessas interações e sua potência de sinalização são determinadas pela capacidade das galectinas de dimerizar ou oligomerizar, em conjunto com a estrutura, o número e a densidade de epítomos de glicanos nas glicoproteínas (Dam e Brewer, 2010; Blidner et al., 2015).

Figura 1 – Tipos, locais de atuação e funções das galectinas



Galectinas podem ser classificadas em três tipos: a) protótipo, caracterizada por conter um CRD e de formar dímeros (galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -16); b) quimera, caracterizada por conter

um CRD conectado a uma região N-terminal não-lectina e oligomerizar ao formar um complexo de monômeros (Glectina-3); c) *Tandem-repeat*, caracterizada por conter dois CRDs distintos entre si e interconectados por um peptídeo ligante (glectinas -4, -6, -8, -9 e -12). MEC: Matriz Extracelular. Fonte: A autora com Biorender (2025).

3.1.1 Funções das glectinas

As glectinas estão envolvidas em diversos processos biológicos, como adesão celular, quimiotaxia, regulação do crescimento celular, imunomodulação, inflamação, embriogênese, metástase e *splicing* do pré-RNA mensageiro (Rabinovich, 1999). Especificamente, as glectinas -1, -2, -3, -4 e -7 são expressas em células epiteliais e mucosas de regiões do trato gastrointestinal, como estômago e intestino, e podem modular respostas imuno inflamatórias e tumorigênicas, amplificando-as ou atenuando-as (Sundblad et al., 2018; Negedu, Duckworth e Yu, et al., 2022; Kolobovnikova et al., 2018; Gitt et al., 1998; Alves et al., 2011).

Essas glectinas regulam a endocitose de glicoproteínas e glicolipídios da membrana plasmática, e desempenham papéis importantes na resposta pró- e anti-inflamatória, na imunidade inata e adaptativa, nos processos de reparo celular, bem como no desenvolvimento e progressão de diversos tipos de câncer (He e Baum, 2006; Henderson e Sethi, 2009; Chen et al., 2014; Nabi et al., 2015; da Rosa et al., 2021) (Figura 2).

A progressão do câncer e metástase é principalmente promovida por alterações genéticas e epigenéticas que desregulam a expressão e função de metaloproteinases de matriz extracelular (Bjorklund e Koivunen, 2005; Curran e Murray, 1999). Ao interagirem com integrinas, caderinas e fibronectina, as glectinas desencadeiam efeitos que aumentam a capacidade invasiva dos tumores (Wu et al., 2009; Yang et al., 2024; Sedlář et al., 2021; Advedissian et al., 2017; Ozeki et al., 1995).

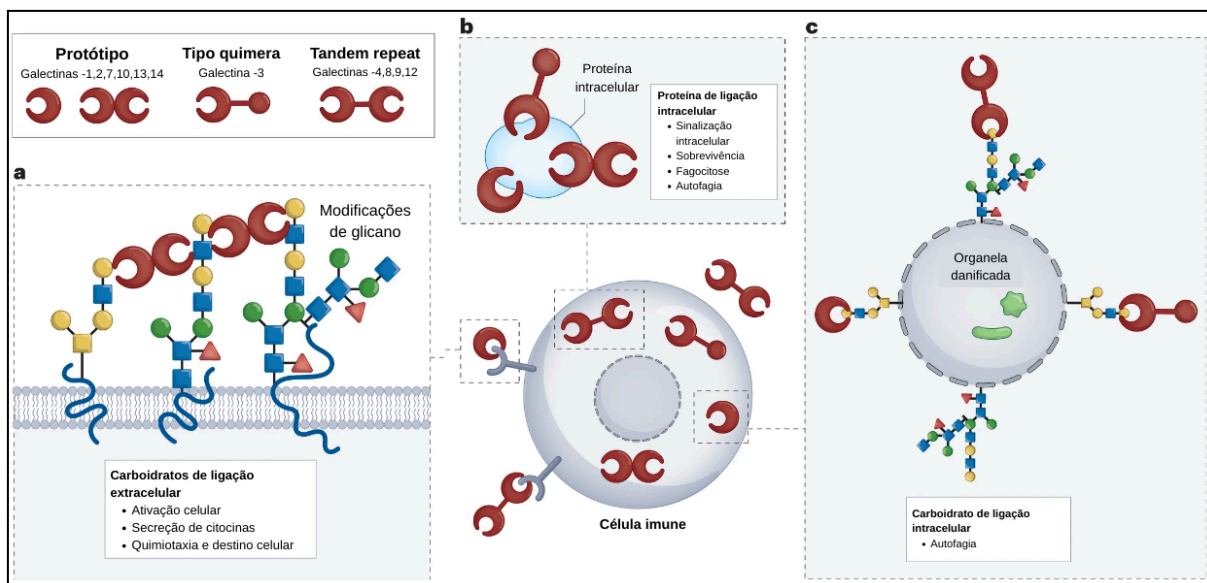
Estudos recentes vêm destacando o papel essencial das glectinas na mediação das interações célula-célula e célula-MEC, com implicações relevantes em processos imunológicos e tumorais (Gabius et al., 1997; Rabinovich et al., 1999; Ochieng, Furtak e Lukyanov, 2002; He e Baum, 2006; Nobumoto et al., 2008; Vasta et al., 2012). A inibição *in vivo* da expressão de glectina-3 (Gal-3) em células-tronco tumorais de próstata, resultou na redução do crescimento tumoral e da invasividade,

o que evidencia seu efeito tumoral (Caputo, 2020). Em contrapartida, a Galectina-9 (Gal-9) mostrou efeito anti-tumoral ao suprimir a adesão de células de melanoma da linhagem B16F10 *in vitro*, aos componentes da MEC — colágeno tipos I e IV, fibronectina, laminina, vitronectina —, bem como ao ácido hialurônico via CD44, molécula adesiva expressa por essas células tumorais (Nobumoto et al., 2008).

As galectinas exercem função imunomodulatória ao regular a atividade de células imunes e são mediadores em diferentes fases da resposta inflamatória. Macrófagos exibem grande plasticidade e adaptam seu fenótipo ao microambiente inflamatório, polarizando-se nos subtipos M1 (pró-inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório/reparador) (Pérez e Rius-Pérez, 2022; Chen et al., 2023). As galectinas -1, -3 e -9 participam ativamente da polarização de macrófagos, favorecendo o reparo tecidual (Li et al., 2022; Shirakawa et al., 2018; Lv, Bao e Li, 2017; Liu e Stowell, 2023). Em amostras de sangue humano, a galectina-1 (Gal-1) demonstrou inibir a adesão de linfócitos T à MEC, incluindo laminina, fibronectina e colágeno tipo IV. Esse efeito foi revertido com o bloqueio da Gal-1, evidenciando sua função supressora em processos inflamatórios e autoimunes (Rabinovich et al., 1999).

Em estudo recente, a Gal-1 presente em exossomos derivados de células-tronco mesenquimais, promoveu a polarização de macrófagos M2 por meio da via JAK-STAT (Li et al., 2022). A Gal-3, via IL-10/STAT3, contribui para a indução de macrófagos produtores de osteopontina — molécula associada à eliminação de detritos celulares e à fibrose reparadora — no contexto de infarto do miocárdio (Shirakawa et al., 2018). Já a superexpressão de Gal-9 foi correlacionada à maior atividade de TGF- β , IL-10 e STAT3, marcadores clássicos do perfil M2 (Lv, Bao e Li, 2017).

Figura 2 – Galectinas são reguladoras únicas da imunidade do hospedeiro



Classificação de galectinas em prototípicas, químera e *Tandem-repeat*. a) As galectinas extracelulares podem se envolver em sequências padrões repetidas de glicano comuns de diferentes glicoproteínas e glicolipídios, expressos na superfície da maioria das células. As galectinas podem ligar-se a uma ampla variedade de receptores de glicoproteínas e glicolipídios, o que pode resultar em sinalizações distintas a depender do tipo de receptor envolvido. As modificações de glicano de proteínas da superfície celular podem mudar após eventos de ativação e diferenciação celular, e gerar o envolvimento da galectina em alvos de glicoproteínas ou glicolipídios completamente diferentes e, portanto, diferentes resultados de sinalização celular. Em células imunes (células imunes inatas, como macrófagos e células dendríticas, e células imunes adaptativas, como células T e células B), essas interações podem afetar a ativação celular, secreção de citocinas inflamatórias, quimiotaxia e destino celular. b) As galectinas são sintetizadas, secretadas ou residem no citosol, devido à falta de uma sequência de sinal clássica, mas também podem deslocar-se para o núcleo. As galectinas citosólicas podem impactar a sinalização celular ligando-se diretamente a alvos intracelulares, como BCL-2 e proteína X interativa com ALG2 (ALIX), através de interações independentes de carboidratos. Isso pode afetar a sinalização celular, sobrevivência, fagocitose e autofagia. c) As galectinas intracelulares podem se ligar a glicanos expostos após dano em organelas, induzindo autofagia. Fonte: Adaptado de Liu e Stowell (2023).

3.1.2 Galectinas -1, -3, -4, -8 e -9 na neuroinflamação em distúrbios neurológicos

Desde os estudos pioneiros sobre galectinas, já se especulava seu possível envolvimento na formação de conexões sinápticas em regiões cerebrais (Teichberg et al., 1975; Barondes et al., 2008). Até o final da década de 1990, porém, os conhecimentos sobre as funções *in vivo* das galectinas ainda eram limitados, sendo mais bem descritos seus papéis bioquímicos (Rabinovich et al., 1999). Dentre as 15 galectinas conhecidas, as isoformas -1, -3, -4, -8 e -9 são expressas no SNC e modulam respostas celulares e moleculares associadas à neuroinflamação e à

neurodegeneração (Díez-Revuelta et al., 2017; da Rosa et al., 2021; Chen et al., 2014; Ferreira, 2022; Brocca et al., 2022; Peixoto e da Rosa, 2025).

O padrão de expressão das galectinas varia entre as regiões cerebrais, o que sugere uma especialização funcional de acordo com a fisiologia de cada área do SNC (Chen et al., 2017). Estudos pré-clínicos *in vitro*, *in vivo* e análises *post-mortem* destacam o papel dessas galectinas – especialmente as isoformas -1, -3, -4, -8 e -9 – em processos como disfunções cognitivas, regulação da resposta imunoinflamatória, modulação da plasticidade sináptica, neurodegeneração e neuroproteção, com destaque para a atuação glial, em especial da microglia (Gomes et al., 2024) (Figura 3).

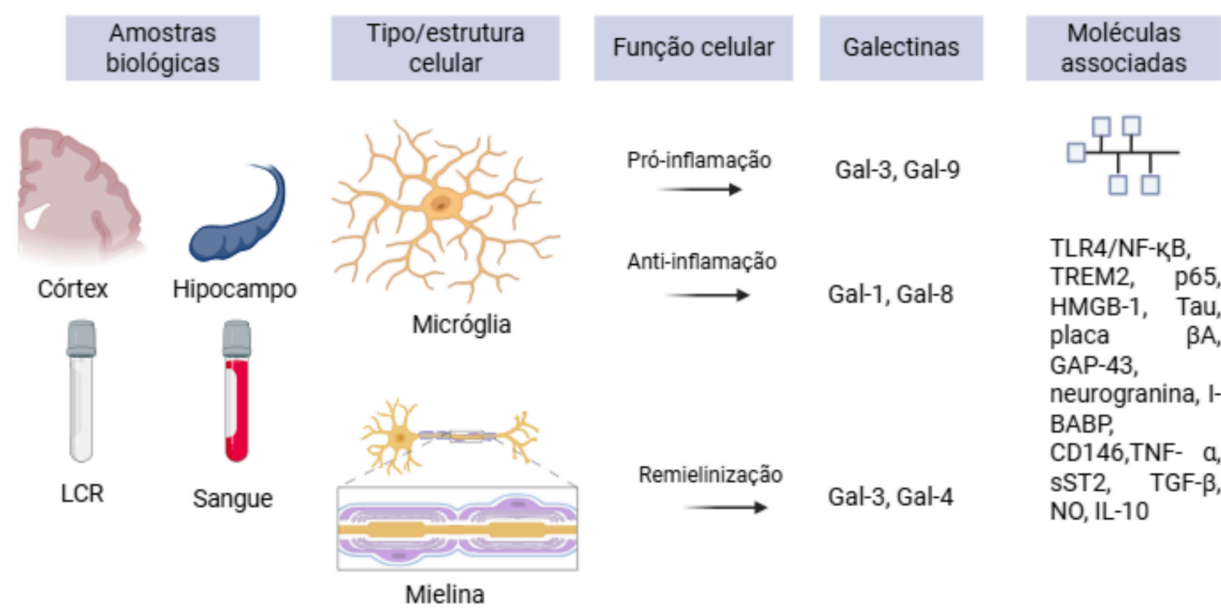
A microglia é uma célula imunovigilante derivada da medula óssea, capaz de processar e apresentar antígenos, secretar citocinas e quimiocinas, além de fagocitar elementos celulares danificados ou patógenos (Voet, Prinz e Van Loo, 2019; Ludwig, 2023). Durante processos inflamatórios, a microglia prolifera, modifica sua morfologia e forma agregados ao redor de áreas lesionadas ou de neurônios em morte celular, promovendo a limpeza de detritos teciduais após injúrias ou em doenças neurodegenerativas (Voet, Prinz e Van Loo, 2019; Ludwig, 2023). Entre as galectinas com papel microglial relevante, destaca-se a Gal-3. Ela regula processos de neurodegeneração mediados por microglia ativada, induzindo mecanismos pró-inflamatórios, como a produção de citocinas e o estresse oxidativo (Gomes et al., 2024). Em amostras corticais humanas com Doença de Alzheimer (DA) e em camundongos envelhecidos, observou-se maior expressão de Gal-3 em microglias localizadas próximas a placas de β -amiloide, alteração ausente nos controles (Boza-Serrano et al., 2019). Em tecidos neocorticais e hipocampais de pacientes com DA de início precoce, a Gal-3 foi detectada em microglias próximas a placas amiloides maiores e mais irregulares, além de neurônios contendo agregados de proteína tau (Boza-Serrano et al., 2022; Gomes et al., 2024). Em camundongos idosos com déficits cognitivos induzidos por LPS, o *knockdown* de gal-3 reduziu a neuroinflamação e a apoptose neuronal hipocampal por inibição da via TLR4/NF- κ B, favorecendo a melhora do desempenho cognitivo (Chen et al., 2022; Gomes et al., 2024).

De forma semelhante, a Gal-1 microglial também vem sendo relacionada à imunomodulação em doenças neurodegenerativas (Gomes et al., 2024) (Figura 3). Dados transcriptômicos de ratos revelaram uma redução significativa da expressão

de gal-1 com o envelhecimento (Kiss et al., 2023; Gomes et al., 2024). *In vitro*, a Gal-1 atenuou a secreção de TNF e óxido nítrico por microglias estimuladas com LPS, ao mesmo tempo em que aumentou a produção de IL-10 e TGF- β , o que sugere um perfil anti-inflamatório (Wang et al., 2015; Gomes et al., 2024) (Figura 3). Em pacientes com Doença de Parkinson, observou-se baixos níveis de Gal-1 no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Marques et al., 2019; Gomes et al., 2024). Modelos experimentais indicam que a Gal-1 pode atenuar a neurodegeneração via modulação microglial (Starossom et al., 2012).

Quanto à função imunomoduladora do cérebro em doenças crônicas transmissíveis e não transmissíveis, destacam-se a Gal-9 e Gal-3. Em um estudo com amostras *post-mortem*, observou-se uma relação entre elevação de Gal-9 no LCR, ativação imunológica do SNC e baixo desempenho cognitivo, em indivíduos mais velhos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Premeaux et al., 2019; Gomes et al., 2024) (Figura 3). Em um estudo com camundongos que desenvolveram malária cerebral, observou-se associação entre a Gal-9 e o CD146 na agregação de hemácias e linfócitos infectados (Duan et al., 2021; Gomes et al., 2024) (Figura 3). Em amostras séricas de humanos com DA foi visto correlação positiva entre a G-9 e a proteína de ligação ao ácido biliar ileal humano (I-BABP) (Wang et al., 2019; Gomes et al., 2014) (Figura 3). Em um estudo com ratos que desenvolveram isquemia/reperfusão renal, houve expressão gênica significativa de Gal-3 hipocampal, NF- $\kappa\beta$, p65 e do grupo box-1 de alta mobilidade (HMGB-1), quando comparado ao placebo quando comparado ao placebo (Hassan et al., 2023; Gomes et al., 2024) (Figura 3).

Figura 3 – Estruturas cerebrais, tipos/estruturas celulares e moléculas associadas às galectinas



Resumo ilustrativo dos resultados incluídos da revisão. Nos estudos foram incluídas amostras séricas, corticais, hipocámpais, e de líquido cefalorraquidiano de estudos *in vivo* e *post-mortem* de humanos diagnosticados com tauopatias, como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson. Foi visto regulação positiva das galectinas-3 e -9 na micróglia ativada, eventos pró-inflamatórios e disfunções sinápticas em regiões associadas à memória e aprendizado no sistema nervoso central. As galectinas-1 e -8 microgliais foram associadas a eventos anti-inflamatórios, enquanto as galectinas -3 e -4 foram associadas a neuroproteção através da remielinização neuronal. LCR: líquido cefalorraquidiano; TLR4: receptores *Toll-like* 4 (do inglês, *Toll-like Receptor 4*); NF-κB: fator nuclear Kappa B (do inglês, *Nuclear factor kappa B*); TREM2: Receptor de gatilho expresso em células mieloides 2 (do inglês, *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*); HMGB1: Box de grupo de alta mobilidade 1 (do inglês, *High mobility group box 1*); BABP: ácido biliar ileal humano; CD146: cluster de diferenciação 146 (do inglês, *Cluster of Differentiation 146*); TNF-α: Fator-α de Necrose Tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Factor-α*); sST2: Supressão solúvel da tumorigênese-2 (do inglês, *Soluble suppression of tumorigenesis-2*); TGF-β: Fator-β de Crescimento Transformador (do inglês, *Transforming growth factor-β*); NO: óxido nítrico (do inglês, *Oxid Nitric*); IL-10: Interleucina-10. Fonte: Gomes e colaboradores (2024).

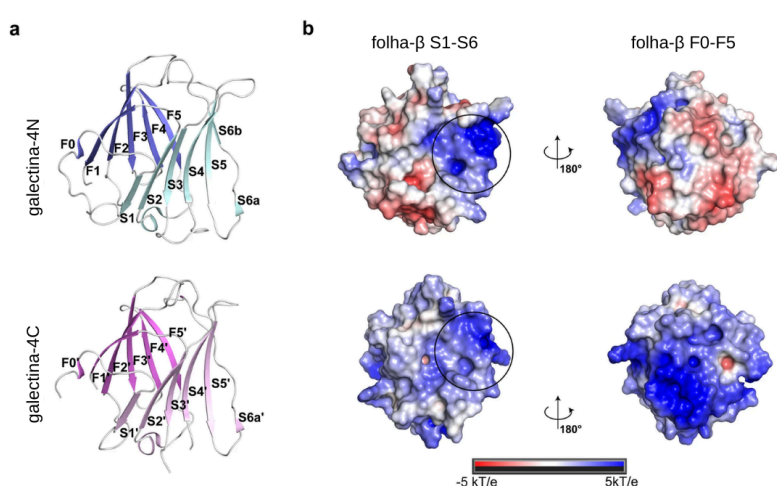
Estudos recentes sugerem ainda um papel neuroprotetor das galectinas na restauração do equilíbrio neuroimune em distúrbios psiquiátricos. Em um estudo com pacientes diagnosticados com esquizofrenia, observou-se correlação entre os níveis séricos de Gal-3 e a citocina pró-inflamatória TNF, com o marcador sST2 solúvel, e associação negativa com a citocina TGF-β (Minic Janicijevic et al., 2022; Gomes et al., 2024) (Figura 3). Isso indicou que a Gal-3 pode contribuir para a inflamação sistêmica periférica contínua e a duração da doença (Minic Janicijevic et al., 2022).

Peixoto e Rosa (2025) sugerem que as galectinas -1, -3, -4, -8 e -9, modulam vias inflamatórias e apoptóticas ao regular a função mitocondrial e estresse oxidativo (Cummings et al., 2022; Mielczarek-palacz et al., 2022). Por exemplo, a Gal-3 endógena pode ser liberada no contexto de neuroinflamação e interagir com o receptor TLR4 na microglia, promovendo uma resposta pró-inflamatória M1. Após lesão cerebral traumática, esse mecanismo pode agravar a inflamação e a perda neuronal. Além disso, a ativação do TLR4 tem sido associada à fisiopatologia da depressão, por afetar a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferir na neurotransmissão glutamatérgica e gabaérgica (Burguillos et al., 2015; Stajic et al., 2019; Shin, 2022; Peixoto e Rosa, 2025).

3.1.3 Galectina-4

A Gal-4 é classificada como *tandem-repeat*, e contém 2 CRDs distintos: a) a Galectina-4N, localizada no N-terminal; b) a Galectina-4C, localizada no C-terminal (Rustiguel et al., 2016) (Figura 4a). Foi possível observar via técnica de cristalografia de raios-X, que a Gal-4 é composta de 323 resíduos de aa distribuídos nas seguintes divisões: domínio N-terminal (aa 1–150; Galectina-4N), peptídeo de ligação (aa 151–178) e domínio C-terminal (aa 179–323; Galectina-4C) (Figura 4a).

Figura 4 – Estruturas cristalinas dos domínios Galectina-4N e Galectina-4C



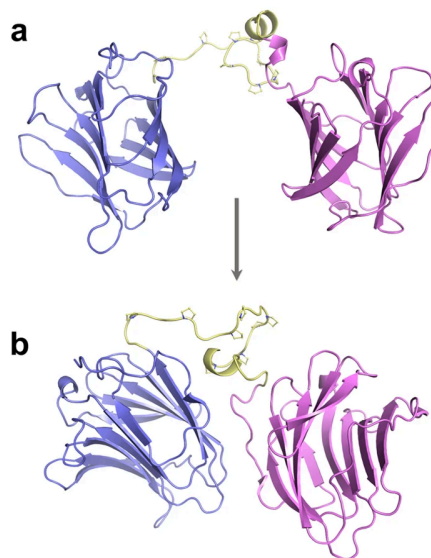
(a) Folhas sanduíche- β das estruturas de Galectina-4N (azul) e Galectina-4C (rosa). As folhas- β antiparalelas são mostradas em azul (F0-F5), ciano (S1-S6a/b) para Galectina-4N, rosa (F0'-F5') e rosa claro (S1'-S6a') para a Galectina-4C. (b) Superfície de potencial eletrostático para as estruturas Galectina-4N e Galectina-4C. Na escala em unidade de medida kT/e, que

consiste no potencial eletrostático em energia térmica por carga elementar, as cargas positivas estão na cor azul, as cargas negativas estão na cor vermelha e as áreas neutras estão em branco. Vista frontal (folha- β nas coordenadas S1-S6/S1'-S6') e vista traseira (folha- β nas coordenadas F0-F5/F0'-F5'). O círculo marca o sítio de ligação canônico. Fonte: Adaptado de Rustiguel e colaboradores (2016).

Na Figura 4b, é possível observar a superfície eletrostática da Gal-4 no formato tridimensional, nas orientações frontal e traseira. O desvio quadrático médio (RMSD) mede a distância média entre átomos C α de moléculas sobrepostas, comparando estruturas em modelo de docking com estrutura de referência (Rustiguel et al., 2016). C α são átomos de carbono tetraédrico de posição central em aminoácidos, que ligam-se a um átomo de hidrogênio, um grupo amino, um grupo carboxila e uma cadeia lateral (Oldfield e Hubbard, 1994). Os domínios Galectina-4N e Galectina-4C, compartilharam um RMSD de 1,2 Å entre átomos de C α (Rustiguel et al., 2016), o que indica alta semelhança estrutural. Também foi visto uma diferença na distribuição de carga na superfície do potencial eletrostático, onde na Galectina-4C há predominância de carga elétrica positiva, e na Galectina-4N há uma distribuição mais heterogênea com uma região positiva localizada no sítio de ligação (Rustiguel et al., 2016) (Figura 4b).

Na Figura 5 é possível observar a união das estruturas Galectina-4N e Galectina-4C em uma única cadeia polipeptídica (Rustiguel et al., 2016). Após ter sido submetida a um refinamento conformacional, a Gal-4 exibiu quatro estruturas secundárias do tipo folhas- β antiparalelas conectadas por um peptídeo-ligante, descrito por Rustiguel et al. (2016) como uma dobradiça rica em prolina, seguida por uma α -hélice curta (aminoácidos 170–173) e uma região estendida (Figura 5).

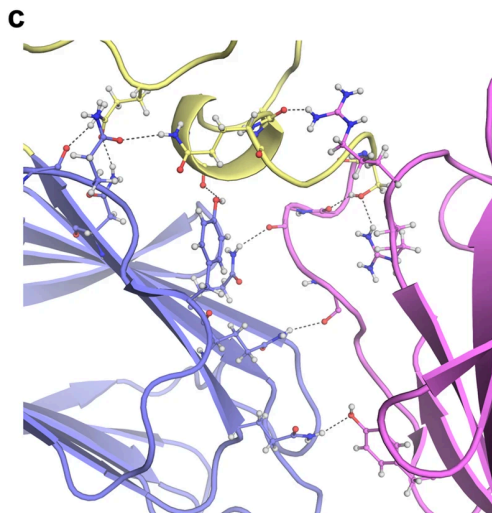
Figura 5 – Modelo do comprimento total da Galectina-4



(a) Representação em desenho animado do modelo inicial de comprimento total da Gal-4. (b) Dobramento geral do modelo de Gal-4 após dinâmica de equilíbrio e otimização da geometria. Fonte: Adaptado de Rustiguel e colaboradores (2016).

É possível identificar uma estrutura compacta, com CRDs que têm a interação entre si estabilizada por ligações de hidrogênio (Figura 6). A organização estrutural, química e a diversidade dinâmica desses CRDs pode aumentar propriedades adesivas, a potência e a pluralidade de eventos dependentes de carboidratos, uma vez que quando essas regiões são mutadas há um comprometimento da promoção dessas funções (Levy et al., 2006; Rustiguel et al., 2016). Ainda permanecem elusivos estudos sobre a estrutura e dinâmica de galectinas *tandem-repeat* e sua relação com processos fisiológicos e patológicos (Rustiguel et al., 2016). Esses estudos podem ser desafiantes devido à flexibilidade antecipada e alta susceptibilidade à proteólise (Rustiguel et al., 2016). A ligação do ligante às proteínas pode induzir mudanças conformacionais que variam de rearranjos locais de cadeias laterais a grandes movimentos de domínio (Huang et al., 2010). Essas proteínas podem apresentar alto tamanho e variado grau de liberdade, o que dificulta o encaixe molecular e caracteriza a flexibilidade como fator desafiante no docking-molecular (Huang et al., 2010).

Figura 6 – Representação de interações entre os domínios galectina-N e galectina-C, mediadas por ligações de hidrogênio



Fonte: Adaptado de Rustiguel e colaboradores (2016).

Estudos em humanos demonstram que a Gal-4 regula diferentes vias moleculares e celulares da resposta anti-inflamatória, pró-inflamatória e imunológica inata e adaptativa (Chen et al., 2014; Paclik et al., 2008; Bum-Erdene et al., 2016; Stowell et al., 2010; Jan et al., 2024). Em estudos clínicos e observacionais transversais, foi visto uma expressão elevada de níveis teciduais e plasmáticos da Gal-4 durante processos inflamatórios crônicos na diabetes gestacional (Schrader et al., 2022), insuficiência cardíaca (Dieden et al., 2023), infarto (Jujic et al., 2023) e obesidade (Korduner et al., 2022). A Gal-4 apresenta efeitos antagonistas quanto perfil de mudanças fenotípicas e funcionais do ciclo celular. Em amostras de sangue total humano, a Gal-4 foi capaz de melhorar o tempo de sobrevivência de linfócitos T CD4⁺ ao reduzir níveis da enzima caspase-3, de apoptose e não afetou sua proliferação celular (Hong et al., 2019). O tratamento de monócitos com Gal-4 melhorou a expressão de receptores do tipo Toll (do inglês, *Toll-like Receptors*) TLR-1, TLR-4 e TLR-6, aumentou a expressão de citocinas e da matriz de metaloproteinases e reduziu sua capacidade fagocítica, respectivamente (Hong et al., 2019). Além disso, foi observado que a ligação da Gal-4 ao CD14 de monócitos induziu sua diferenciação em células semelhantes a macrófagos através da ativação da cascata de sinalização MAPK mediada por TLR-4 (Hong et al., 2019). Monócitos tratados com Gal-4 tornaram-se aderentes e demonstraram morfologia alongada com maior expressão de marcadores de macrófagos, em comparação aos não

tratados (Hong et al., 2019). Dados de sequenciamento de RNA (RNA-seq) mostraram que a Gal-4 aumenta a função imunoestimulatória em macrófagos M2 ao regular padrões de expressão gênica (Lee et al., 2023). Além disso, a Gal-4 melhorou a resposta antiviral mediada pela ativação de receptores toll-like 7 (TLR7) de macrófagos M2, através do aumento da expressão de MHC-II, CD86, CD40 e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IFN- α e IL-10, mas não em macrófagos M1 (Lee et al., 2023). A Gal-4 também melhorou a resposta antiviral de macrófagos M2 através da ativação da resposta de células TCD4+ (Lee et al., 2023).

No câncer colorretal, o *knockdown* e *down-regulation* da Gal-4 *in vitro* resultou em aumento da proliferação celular, migração e motilidade, através da ativação da via IL-6/NF- κ B/STAT3 (Kim et al., 2013), e sua expressão regulou negativamente genes alvos da via de sinalização Wnt, que está desregulada no câncer (Satelli et al., 2011). A Gal-4 afeta diferentes perfis de glicanos da classe dos glicoesfingolipídeos, células cancerígenas gástricas malignas com alto potencial de disseminação peritoneal (Hachisu et al., 2023). Estudos também sugerem a Gal-4 como potencial biomarcador de prognóstico de recorrência precoce e metástase de carcinoma hepatocelular (Cai et al., 2014), adenocarcinoma ductal pancreático (Hu et al., 2019; Gabriel et al., 2014), adenocarcinoma de cólon (Acharjee et al., 2021) e carcinoma urotelial da bexiga (Ding et al., 2019).

3.1.4 *Galectina-4 no SNC*

Há um tempo atrás, acreditava-se que a Gal-4 era expressa exclusivamente no trato gastrointestinal (Gitt et al., 1998; Paclik et al., 2008). Hoje, sabe-se que ela é expressa em diferentes regiões do SNC, como em neurônios de regiões corticais, do hipocampo, de gânglios da raiz dorsal, em neurônios olfativos e do corpo caloso (Velasco et al., 2013; et al., Stancic et al., 2012). Alguns estudos *in vitro* apontam que a Gal-4 regula a biogênese das bainhas de mielina e o transporte axonal de glicoproteínas sinápticas, e pode ser expressa em axônios neuronais e células da glia (da Rosa et al., 2021; Stancic et al., 2012). A expressão da Gal-4 foi mais proeminente em neurônios corticais, e menor em oligodendrócitos, micróglia e astrócitos (Stancic et al., 2012).

Oligodendrócitos (OLGs) são células gliais promotoras da mielinização axonal, e com isso fortalecem uma rápida transmissão sináptica neuronal. A

atividade de mielinização por OLGs depende da presença de moléculas indutoras locais, e a Gal-4 parece regular esse processo (Díez-Revuelta et al., 2017). A Gal-4 expressa em domínios de membranas axonais neuronais foi tida como a primeira inibidora da mielinização ao bloquear a maturação de precursores de OLGs progenitores (OPCs) – impedindo a diferenciação de estágios imaturos para estágios maduros (Díez-Revuelta et al., 2017). Na Esclerose Múltipla (EM), há o comprometimento da diferenciação de OPCs em OLGs maduros – processo que ocorre durante a remielinização em áreas desmielinizadas (de Jong et al., 2018). A Gal-4 parece regular essa diferenciação, uma vez que OPCs expressam transitoriamente receptores de superfície celular que se ligam à Gal-4 (Stancic et al., 2012) (Figura 7). Em cérebros de ratos em desenvolvimento pós-natal, foi visto redução da expressão de Gal-4 endógena no início da mielinização em co-culturas de OLG e gânglios da raiz dorsal neurônios (Stancic et al., 2012). Um estudo *in vitro* sugeriu que a reexpressão transitória de Gal-4 neuronal após desmielinização envolvendo micróglia e macrófagos ativados, regulou o fino ajuste da diferenciação de OPCs (de Jong et al., 2018). No entanto, expressão e secreção persistente de Gal-4 em axônios desmielinizados e sua presença na micróglia/macrófagos, pode interromper o amadurecimento de OPCs e o comprometer o ajuste fino da remielinização (de Jong et al., 2018).

Figura 7 – Ilustração de potenciais papéis da expressão da Gal-4 durante a formação da bainha de mielina e após dano neuronal

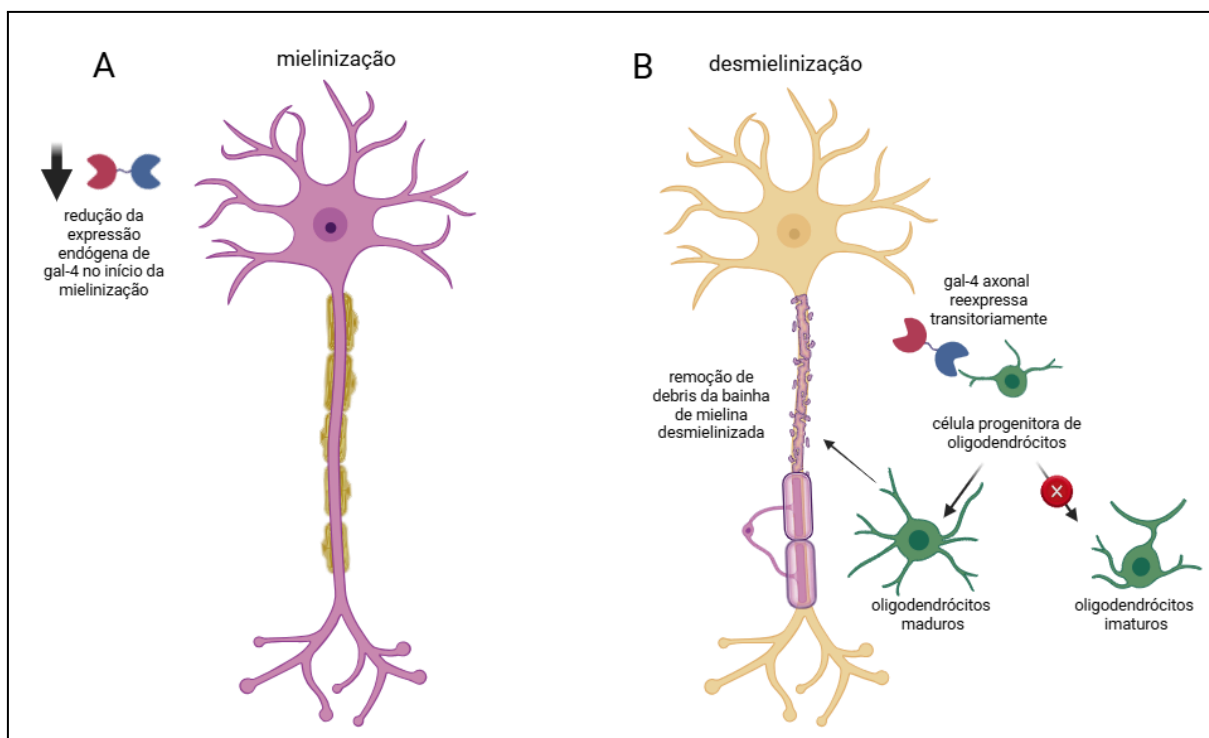


Ilustração dos resultados observados por Stancic et al. (2012) e de Jong et al. (2018). Em A, a redução da expressão da Gal-4 está possivelmente correlacionada com o início da mielinização. Em B, é possível observar que a Gal-4 reexpressa transitoriamente pode ligar-se a receptores de células progenitoras de oligodendrócitos, impedir a diferenciação em células maduras e promover a diferenciação em oligodendrócitos maduros, capazes de remover debris da bainha de mielina desmielinizada. Fonte: Autora com Biorender (2025).

Embora uma quantidade grande de estudos *in vivo* e *in vitro* especulem sobre o papel fundamental da Gal-4 na mielinização, um estudo recente mostrou que o *knockdown* de Gal-4 em camundongos não comprometeu a composição, função ou organização da bainha de mielina de neurônios corticais de ratos mutados (Brocca et al., 2022).

A Gal-4 sérica apresenta potencial papel como biomarcadora não-invasiva de DNs, como a Doença de Parkinson (DP) e seus estágios avançados (Cengiz et al., 2019). No entanto, os estudos sobre seu papel no SNC e em DNs são escassos na literatura.

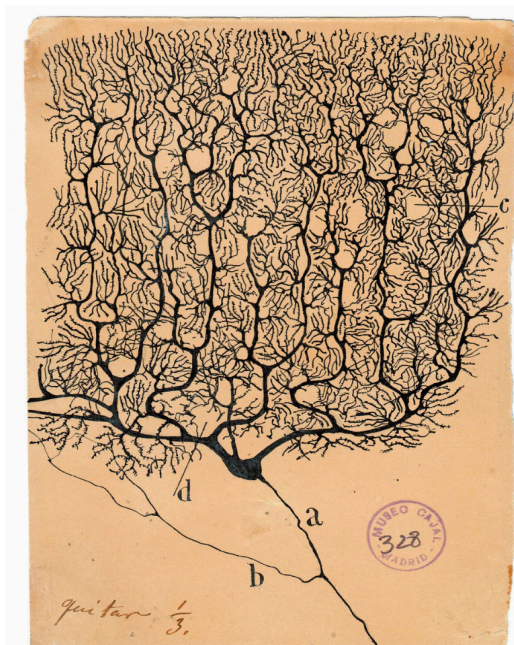
Considerando o papel da Gal-4 como uma molécula anti-inflamatória, sua regulação da estrutura sináptica por meio da organização de glicoproteínas e sua potencial participação na promoção da mielinização, esse trabalho analisa, pela

primeira vez na literatura científica, se a Gal-4 está relacionada à homeostase neuronal, plasticidade sináptica, memória, e neuromodulação.

3.2 Plasticidade sináptica, memória e aprendizado

No início do século XX, o neurocientista espanhol Ramón y Cajal propôs que a aprendizagem se baseia na formação de novos circuitos neurais, resultantes do crescimento e ramificação de dendritos e axônios — um processo que ele chamou de "ginástica cerebral" (Rozo, Martínez-Gallego e Rodríguez-Moreno, 2024). A partir dessas observações, começa-se a compreender como os neurônios são ativados, a relevância das sinapses na comunicação entre eles e o papel central do sistema nervoso central na regulação das funções corporais. Essa perspectiva abre caminho para o entendimento moderno da plasticidade sináptica, mecanismo fundamental por meio do qual o cérebro adapta suas conexões em resposta à experiência e ao aprendizado. Na Figura 8, é possível observar como funciona a dinâmica e comunicação de neurônios adaptados, na visão de Cajal.

Figura 8 – Célula de Purkinje extraída do cerebello humano desenhada por Cajal



Desenho feito por Cajal, de um tipo de neurônio denominado Célula de Purkinje, extraído do cerebello humano na parte de trás da cabeça, área encefálica responsável por regular o equilíbrio de movimentos motores e funções cognitivas como memória, aprendizado, linguagem e alterações emocionais. Publicação pelo Instituto Cajal, Legado Cajal, Conselho Superior de Investigações Científicas, Madrid, Espanha. Fonte: Ehrlich e colaboradores (2022).

A plasticidade sináptica é a capacidade do sistema nervoso de modificar a força ou a eficiência das conexões sinápticas entre neurônios em resposta à atividade neural, experiências ou estímulos ambientais (Mageer e Grienberger, 2020). Trata-se de um processo dinâmico e essencial para a aprendizagem, formação de memórias e adaptação comportamental. Essa modificação pode ocorrer de forma estrutural, com alterações na morfologia das sinapses, como por exemplo o crescimento de espinhas dendríticas, ou funcional, por meio do fortalecimento ou enfraquecimento da transmissão sináptica. Entre os principais mecanismos de plasticidade sináptica estão o potencial de longa duração (LTP, do inglês *Long Term Potentiation*) e a depressão de longa duração (LTD, do inglês *Long Term Depression*), que representam, respectivamente, o aumento e a redução sustentada da eficácia sináptica (Hunt e Castillo, 2012). Esses fenômenos são altamente dependentes da atividade e envolvem cascatas moleculares complexas, incluindo expressão gênica e síntese proteica (Hunt e Castillo, 2012).

O aprendizado refere-se à modificação do comportamento em função da aquisição de conhecimentos sobre o ambiente regulado por processos de plasticidade sináptica, enquanto a memória consiste no processo pelo qual essas informações são adquiridas, consolidadas e posteriormente evocadas (Kandel 2014). Há diversas formas de aprendizado e memória, cada uma com propriedades cognitivas específicas e mediadas por diferentes sistemas encefálicos que se comunicam entre si. Os estudos de Kandel fomentam a literatura com informações importantes sobre tipos de memórias e como a consolidação de informação é estabelecida.

As memórias podem ser classificadas com base na sua duração — de curto ou longo prazo — e também quanto à natureza da informação armazenada, do tipo explícita e implícita (Kandel et al., 2014; Kandel, 2012).

A memória explícita, também conhecida como declarativa, tem sido bem estudada e compreendida desde a metade do século XX (Scoville e Milner, 1957; Squire, 1992; Schacter, Wagner e Buckner, 2000; Kandel, 2012). Ela envolve o armazenamento consciente de fatos e eventos relacionados a pessoas, lugares e objetos, e está fortemente associada ao lobo temporal medial e ao hipocampo (Kandel et al., 2014). Essa forma de memória de longo prazo permite a evocação deliberada de experiências anteriores e a associação de diferentes fragmentos de informação em contextos variados (Kandel et al., 2014).

O processamento da memória declarativa ocorre em três etapas principais:

- a) aquisição – quando novas informações são registradas;
- b) consolidação – fase na qual as informações inicialmente frágeis tornam-se mais estáveis por meio de expressão gênica e síntese proteica, promovendo alterações estruturais nas sinapses;
- c) evocação – processo pelo qual as informações armazenadas em diferentes regiões cerebrais são reativadas. Importante destacar que a evocação não corresponde a uma reprodução exata da memória original, mas sim à reconstrução do evento com base em pistas presentes no momento atual.

Um exemplo clássico de formação de memória explícita é o condicionamento clássico, no qual estímulos previamente neutros passam a evocar respostas por associação com eventos significativos.

Por outro lado, a memória implícita refere-se a formas de aprendizado não conscientes, como habilidades perceptivas, motoras e outras formas de memória procedural. Esse tipo de memória envolve diferentes estruturas encefálicas, como o cerebelo, o corpo estriado e a amígdala (Kandel, 2012).

3.2.1 Sinalização molecular envolvida plasticidade sináptica e consolidação de memórias

A comunicação entre os neurônios ocorre por meio das sinapses, estruturas especializadas que determinam a direção dos sinais nervosos no cérebro e na periferia, permitindo a regulação de diversos sistemas biológicos do organismo (Oostrum e Schuman, 2025). Dentre os tipos de sinapses, a mais bem compreendida é a sinapse química, uma junção célula-célula assimétrica altamente conservada no organismo humano (Schaefer e Nonet, 2001; Chan, Oentaryo e Lee, 2020) (Figura 9). Nela, o potencial de ação — ou impulso nervoso — é transmitido de forma unidirecional de um neurônio para outro, ou para uma célula-alvo não neuronal, por meio da liberação de neurotransmissores (Chan, Oentaryo e Lee, 2020).

As sinapses químicas são compostas por uma membrana pré-sináptica, uma membrana pós-sináptica, a fenda sináptica entre elas, células gliais adjacentes, MEC e moléculas da lâmina basal sináptica (Chan, Oentaryo e Lee, 2020). As células gliais maduras do SNC – oligodendrócitos, astrócitos e microglia – são

responsáveis pela defesa, manutenção e reparo do cérebro, e atuam diretamente na atividade sináptica e na homeostase neuronal. Enquanto oligodendrócitos aumentam a rapidez da transmissão sináptica a partir da promoção de mielinização axonal, a interação entre micróglia e astrócitos regula a formação e eliminação de sinapses – evento presente em doenças neurodegenerativas (Lee e Chung, 2019).

A membrana pré-sináptica, localizada na extremidade de um axônio, converte o sinal elétrico (potencial de ação) em sinal químico, liberando neurotransmissores previamente armazenados em vesículas sinápticas (Figura 9). Essas moléculas atravessam rapidamente (em microssegundos) a fenda sináptica e se ligam a receptores específicos na membrana pós-sináptica, que geralmente está localizada nos dendritos do neurônio seguinte (Caire, Varacallo e Reddy, 2023) (Figura 9).

A sinapse descrita como quadripartite consiste na interação entre elementos pré- e pós-sinápticos, micróglia e astrócitos (Schafer, Lehrman e Stevens, 2013; Huffels, Middeldorp e Hol, 2023) (Figura 9). A micróglia apresenta papel ativo no desenvolvimento, maturação de sinapses e modulação da plasticidade sináptica ao interagir com astrócitos e neurônios (Schafer, Lehrman e Stevens, 2013). A interação entre micróglia depende de contato físico direto e de mediadores moleculares dependentes ou independentes de contato (Schafer, Lehrman e Stevens, 2013). A micróglia ativada modula a neurotransmissão excitatória ao induzir uma rápida produção de ATP microglial que promove o recrutamento de astrócitos que amplificam a produção de ATP e a liberação de glutamato astrocítico que gera aumento das frequências de correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (Pascual et al., 2011; Schafer, Lehrman e Stevens, 2013).

Quando o potencial de ação alcança o terminal axonal, ele promove a despolarização da membrana, o que leva à abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem (Brini et al., 2014). A entrada de íons Ca^{2+} no terminal pré-sináptico desencadeia a liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica (Brini et al., 2014). A interação desses neurotransmissores com os receptores pós-sinápticos pode excitar ou inibir o neurônio seguinte, a depender do tipo de receptor ativado.

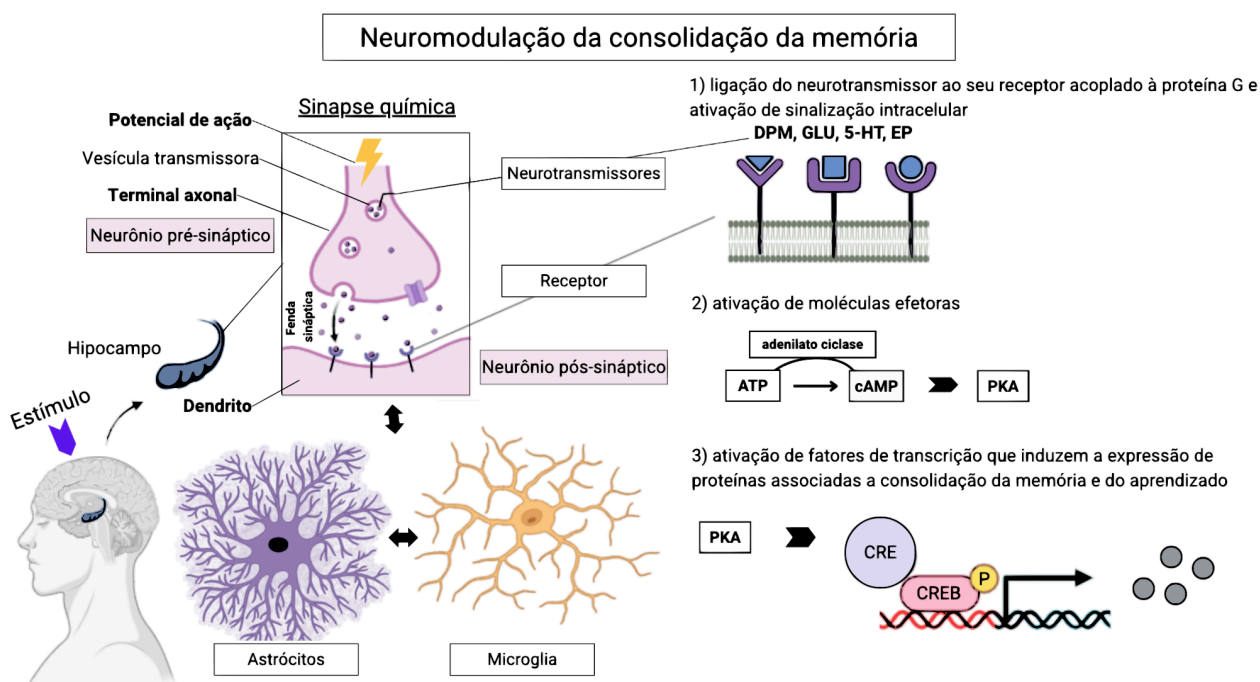
Os receptores da membrana pós-sináptica são proteínas especializadas que se ligam ao neurotransmissor por meio de um componente molecular de ligação exposto na fenda sináptica (Brini et al., 2014). Esses receptores medeiam a ação dos neurotransmissores nos neurônios-alvo, alteram a permeabilidade dos canais

iônicos e, por fim, alteram o potencial de membrana ou ativam vias de sinalização que incluem diferentes reações bioquímicas (Girault e Greengard, 2004).

A plasticidade sináptica envolvendo o sistema glutamatérgico, especialmente sob a forma de LTP, depende da ativação coordenada de receptores, influxo de íons Ca^{2+} e cascatas de sinalização intracelular que modulam a força sináptica. Esse processo inicia-se com a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), através da ligação do neurotransmissor glutamato. A ligação permite a entrada de íons sódio e despolarizam a membrana pós-sináptica (Malenka e Nicoll, 1993). Essa despolarização remove o bloqueio de magnésio dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), permitindo a entrada de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico (Malenka e Nicoll, 1993). O aumento local da concentração de Ca^{2+} é um sinal crucial que ativa diferentes vias de sinalização intracelular, dependendo de sua intensidade e duração. Pequenos aumentos de Ca^{2+} tendem a desencadear processos de LTD, enquanto elevações mais rápidas e intensas promovem LTP (Lisman, 2003).

O Ca^{2+} intracelular ativado estimula enzimas como a calmodulina quinase II (CaMKII), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase A (PKA), que fosforilam outras proteínas sinápticas, incluindo os próprios receptores AMPA, promovendo sua inserção adicional na membrana pós-sináptica e aumentando a eficiência sináptica (Malenka e Nicoll, 1993). Paralelamente, o Ca^{2+} ativa a via de sinalização de proteína ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK, do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase*), que transloca ao núcleo e promove a fosforilação do fator de transcrição proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB, do inglês *cAMP Response Element-binding Protein*). A ativação de CREB é fundamental para a expressão de genes relacionados à consolidação da plasticidade sináptica e à formação de memória de longo prazo (Kandel, 2012; Carlezon, Duman e Nestler, 2005) (Figura 9). Por exemplo, genes codificadores de proteínas sinápticas estruturais e de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) (Bathina e Das, 2015).

Figura 9 – Esquema de principais eventos moleculares na sinalização sináptica na modulação da consolidação da memória



A memória é consolidada por alterações dependentes de síntese proteica em neurônios localizados principalmente no hipocampo- região encefálica subcortical responsável pela formação de memórias espaciais, não espaciais e de curto e longo prazo. Quando o hipocampo é estimulado, há ativação de uma rede de moléculas neuromoduladoras excitatórias como a Dopamina (DPM), o Glutamato (GLU), a Serotonina (5-HT) e a Epinefrina (EP). Essa neurotransmissão excitatória pode ser modulada pela interação entre a micróglia, estruturas pré e pós-sinápticas e astrócitos, fenômeno descrito como sinapse quadripartite. Esses neurotransmissores são liberados de vesículas pré-sinápticas e ligam-se de forma específica a sítios de ligação de receptores acoplados à proteína G, na membrana da superfície de neurônios pós-sinápticos, formando o complexo receptor-ligante. Em seguida esses receptores têm sua conformação proteica alterada, sendo ativados e desencadeiam uma transdução de sinal intracelular. Isso estimula a ativação de proteínas efetoras catalisadoras da produção, ou no caso de íons, da liberação ou do influxo de moléculas do sistema de segundo mensageiro. Após isso, as moléculas do sistema de segundo mensageiro difundem-se em direção a alvos proteicos em outros locais do neurônio, e altera atividade biológica para compor uma resposta à nova informação recebida pelo receptor ao aumentar a atividade de fatores de transcrição, responsáveis por promover ou inibir a expressão gênica associada à plasticidade sináptica, memória e aprendizado. Um exemplo de proteína efetora é a adenilil ciclase que ao ser ativada, produz o segundo mensageiro monofosfato de adenosina cíclica (cAMP, do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*), que ativa a proteína quinase A (PKA, do inglês *Protein Kinase A*), cuja subunidade C pode difundir-se para o núcleo e fosforilar fatores de transcrição como por exemplo a proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB, do inglês, *cAMP-response element binding protein*), responsável por aumentar a transcrição de genes que desempenham um papel na consolidação de memória do medo. Fonte: A autora com Biorender (2025).

Além das modificações funcionais, a consolidação de memórias duradouras requer alterações estruturais nas sinapses, incluindo o crescimento, a remodelação de espinhas dendríticas e a reorganização do citoesqueleto neuronal. Proteínas como PSD-95, Arc e HOMER-1, atuam como elementos-chave na estabilização sináptica e na ancoragem de receptores, favorecendo a manutenção da LTP e a codificação mnemônica na sinapse glutamatérgica (Tzingounis e Nicoll, 2006; Shepherd e Bear, 2011).

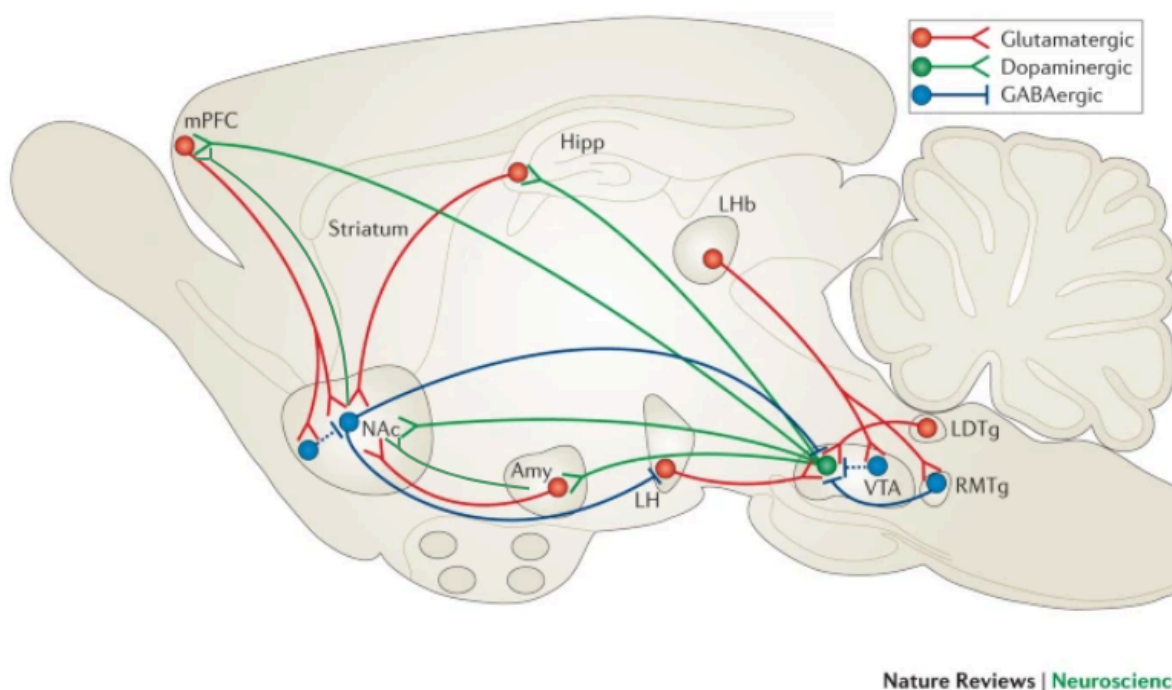
A consolidação da memória depende de Ca^{2+} e da via NMDA-MAPK/ERK-cAMP-PKA-CREB. Ambas constituem um elo funcional entre a atividade sináptica e a regulação da expressão gênica. O monofosfato de adenosina cíclico (cAMP, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*), como segundo mensageiro, traduz a sinalização extracelular em respostas intracelulares duradouras (Rall e Sutherland, 1958; Su et al., 2024). A PKA ativada transloca-se ao núcleo, onde participa da fosforilação de CREB e de outros fatores de transcrição, promovendo a síntese de proteínas necessárias à manutenção da memória de longo prazo, através das alterações morfológicas estruturais que ocorrem nas membranas pré e pós-sinápticas (Mao, Tang e Wang, 2007).

3.2.2 Circuitos-chave na plasticidade sináptica e plasticidade sináptica homeostática

Áreas talâmicas-corticais e subcorticais como o hipocampo, amígdala, e Núcleo Accumbens (NAc) estão interconectadas no circuito de recompensa – principal rede nervosa que regula o processamento de emoções e comportamento social. Há uma projeção de neurônios dopaminérgicos da Área Tegmentar Ventral (ATV) para o NAc (Figura 10) (Russo e Nestler, 2014). O NAc faz parte do corpo estriado ventral e é predominado por neurônios gabaérgicos (Russo e Nestler, 2014). Essas duas estruturas formam então o circuito ATV-NAc, que reconhece recompensas e estímulos aversivos (Russo e Nestler, 2014). Os neurônios dopaminérgicos do ATV e do NA também inervam para várias regiões do Córtex Pré-Frontal (CPF), amígdala central e basolateral e hipocampo (HPC). Já as projeções glutamatérgicas provenientes do CPF, amígdala e HPC, além de formar conexões recíprocas entre si, inervam o NAc (Russo e Nestler, 2014). Estas

estruturas se conversam para que novos estímulos sejam consolidados, sendo eles positivos ou negativos.

Figura 10 – Circuito de recompensa ATV-NAc



CPFm: Córtex Pré-frontal medial; HPC: Hipocampo; HBL, Habenula Lateral; TDL, Tegmento Dorsal Lateral; TMR, Tegmento Rostromedial; ATV: Área Tegmentar Ventral; HL, Hipotálamo Lateral; AMI: Amígdala; NAc: Núcleo Accumbens. Fonte: Adaptado de Russo e Nestler, 2014.

Estas informações são armazenadas a partir de um equilíbrio preciso entre sinalizações excitatórias e inibitórias (Schousboe e Waagepetersen, 2007). A homeostase pode ser regulada via neurotransmissão do ácido aminobutírico (GABA, do inglês *Gamma-Aminobutyric Acid*), que associa-se a eventos de metabolismo, inativação neuronal e biossíntese do GABA, do glutamato e de outras moléculas sinalizadoras como hormônios (Schousboe e Waagepetersen, 2007; Kabala e Janicka, 2024). A regulação da homeostasia gabaérgica modula sua atividade, permitindo-o sustentar o equilíbrio excitatório/inibitório no SNC – fator crítico na proteção do cérebro contra a excitotoxicidade, reduzindo o risco de DNs e desordens mentais (Bi et al., 2020; Bhatt, et al., 2024).

A ativação dos receptores gabaérgicos do tipo GABA-A leva ao influxo de íons cloreto e hiperpolarização da membrana pós-sináptica, inibindo a atividade

neural excessiva (Chen e Sharma, 2025). Essa inibição leva a uma redução da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, como o glutamato – neurotransmissor excitatório do qual o GABA é sintetizado (Chen e Sharma, 2025). Portanto, essa ação inibitória é crucial para o controle da excitabilidade, evitando a excitotoxicidade induzida por estimulação excessiva de glutamato (Davis e Myers, 2002; Castellano et al., 1989; Rosso et al., 2017).

Em distúrbios neuropsiquiátricos, como o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT), a função inibitória de agonistas gabaérgicos está associada a consolidação de aprendizado excitatório e inibitório, enquanto os antagonistas gabaérgicos de receptores do tipo GABA-A facilitam a aquisição de memórias aversivas (Castellano et al., 1989; Yonkov e Georgiev, 1985). Substâncias como Muscimol (agonista) e Picrotoxina (antagonista), modulam experimentalmente esses efeitos e são utilizadas para investigar o papel do GABA em processos mnemônicos e emocionais (McGaugh, Castellano e Brioni, 1990).

Dessa forma, o GABA e o glutamato atuam de maneira complementar e sinérgica na modulação da excitabilidade sináptica, sendo essenciais para o equilíbrio funcional do cérebro, a facilitação dos processos de aprendizado e a redução de sintomas associados a distúrbios emocionais. Além disso, drogas que bloqueiam receptores glutamatérgicos do tipo NMDA tendem a diminuir a atividade neuronal, enquanto agonistas do glutamato fortalecem a comunicação entre os neurônios, potencializando a plasticidade sináptica e consolidação de memórias (Huang et al., 2023). Naturalmente, o bloqueio do estímulo neurológico pode vir através de outras vias de neuromodulação, envolvendo outros transmissores excitatórios, como por exemplo, a dopamina.

3.3 Transtorno de Estresse Pós-Traumático e memória traumática

Sigmund Freud definiu pela primeira vez o trauma como um ataque violento externo que compromete o organismo (Zepf e Zepf, 2008). O TEPT é um exemplo de como respostas desadaptativas ao medo podem levar ao comprometimento persistente da memória, aprendizagem e cognição. Esse transtorno afeta cerca de 3,9% da população global, e envolve múltiplos estágios decorrentes da interação entre o trauma externo e a resposta psicológica interna (Koenen, et al., 2018). Ele causa um alto impacto socioeconômico ao paciente e sistema de saúde (Al Jowf,

2022), Apesar de sua alta prevalência e aumento do risco de desenvolver depressão, ideação suicida e abuso de substâncias, o TEPT frequentemente permanece subdiagnosticado, principalmente em populações vulneráveis (Jannini et al., 2023; Serpeloni et al., 2023).

Esse transtorno surge da exposição a uma variedade de experiências traumáticas como morte real ou ameaçada, ferimentos graves, violência sexual, doméstica ou comunitária, abuso de autoridade e desastres naturais ou causados por ação humana (da Silva et al., 2024; Zepf e Zepf, 2008; Bromet et al., 2017) (Figura 11). Casos de TEPT por violência institucional são subnotificados, principalmente nas periferias de países de renda média e baixa (Serpeloni et al., 2023; Ressler et al., 2022; Masoudnia e Farmani et al., 2024; Devylder, Lalane e Fedina, 2019).

O TEPT é caracterizado pela persistência disfuncional de memórias aversivas, que permanecem intensamente vívidas, fragmentadas e de difícil integração no repertório autobiográfico do indivíduo (Van der Kolk, Burbridge e Suzuki, 1997). Ao contrário das memórias comuns, que passam por um processo adaptativo de extinção ou reconsolidação, memórias traumáticas mantêm-se hiperativas e resistentes ao esquecimento, sendo constantemente reativadas por estímulos associados ao trauma original.

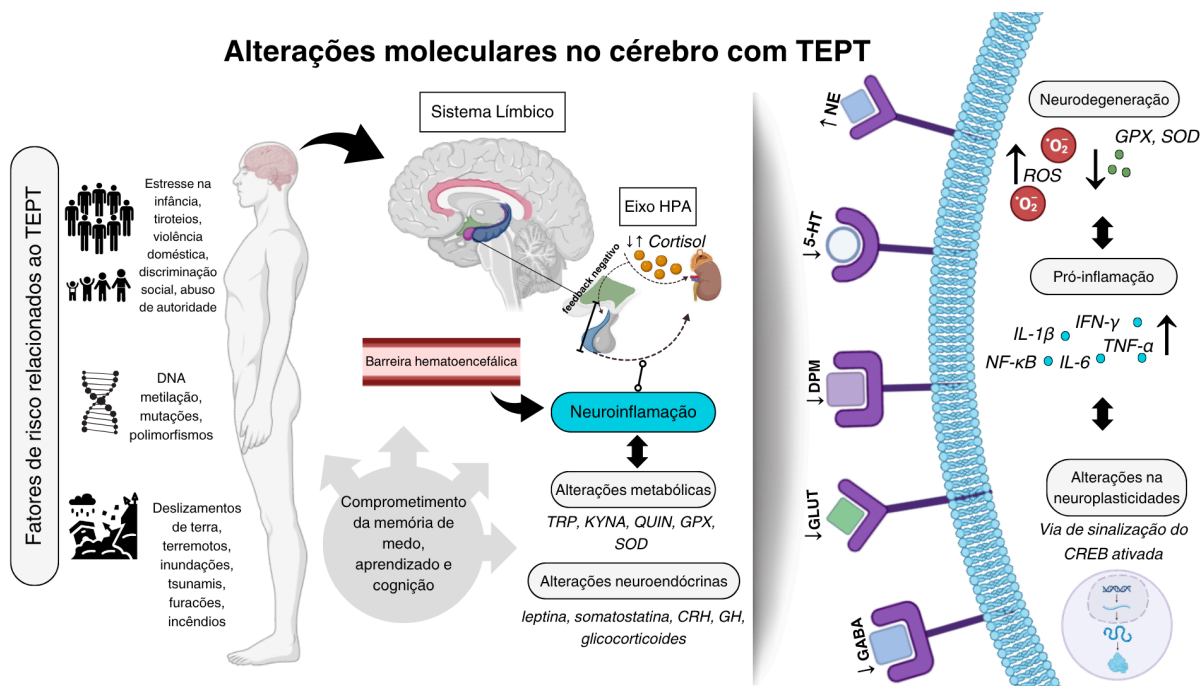
As principais áreas implicadas na consolidação da memória do medo incluem a região CA1 do hipocampo (condicionamento contextual e evitação inibitória), a amígdala basolateral (evitação inibitória) e o córtex pré-frontal, particularmente a região infralímbica (Izquierdo et al., 2016). Mecanismos de plasticidade sináptica sustentam esses processos, e envolvem o LTP e LDP.

Ao receber um estímulo, a ativação das vias de segundos mensageiros em resposta a estímulos, aumenta a atividade dos fatores de transcrição, promovendo a expressão gênica associada à memória e à aprendizagem (Izquierdo et al., 2016). Neurotransmissores como dopamina, glutamato, GABA e norepinefrina ativam cascatas de sinalização que modulam a plasticidade sináptica por meio de receptores acoplados à proteína G e da via CREB (Izquierdo et al., 2016). Disfunções dos sistemas glutamatérgico, GABAérgico e monoaminérgico, têm sido implicadas em uma série de distúrbios neuropsiquiátricos além do TEPT, incluindo depressão e ansiedade (Huang et al., 2023; Duman, Sanacora e Krystal, 2019; Nasir et al., 2020; Michopoulos, Norrholm e Jovanovic, 2015; Liu, Zhao e Guo, 2018).

No TEPT, a expressão glutamatérgica varia de acordo com a área cerebral. Estudos clínicos mostram reduções na força sináptica glutamatérgica no córtex pré-frontal e aumento glutamatérgico no hipocampo (Averill et al., 2022; Rosso et al., 2017). A hiperatividade glutamatérgica pode contribuir para o fortalecimento patológico de memórias traumáticas, enquanto a hipoatividade GABAérgica reduz a capacidade inibitória do cérebro, o que facilita a reconsolidação disfuncional dessas memórias (Huang et al., 2023). A neuroplasticidade, nesse contexto, torna-se mal adaptativa, fixando traços mnemônicos aversivos que resistem à extinção (Figura 11).

O TEPT também está associado à inflamação sistêmica e ao estresse oxidativo (Figura 11). Níveis elevados de proteína C-reativa (PCR) e citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6, foram relatados (Bauer et al., 2010; Dell'Oste et al., 2023). Essas citocinas podem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (Müller e Ackenheil, 1998), aumentar sua permeabilidade e interromper o metabolismo do triptofano (TRP) — um precursor da serotonina (5-HT). O metabolismo alterado do TRP leva ao aumento dos níveis de metabólitos neurotóxicos da quinurenina, como o ácido quinurênico (KYNA) e o ácido quinolínico (QUIN), que modulam a atividade do receptor NMDA e contribuem para a neurotoxicidade (Dell'Oste et al., 2023). Ao mesmo tempo, a expressão reduzida de enzimas antioxidantes, incluindo glutatona peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD), exacerba a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS), promovendo ainda mais a neurodegeneração (Kmita, Pinna e Lushchak, 2023).

Figura 11 – Mecanismos moleculares por trás do Transtorno de Estresse Pós-traumático



O desenvolvimento do TEPT pode ser induzido pela exposição humana a fatores de risco de natureza física, psicossocial, epigenética e biológica, que levam à disfunção na neurotransmissão, metabolismo, resposta imune e inflamatória ao estresse. A barreira hematoencefálica (BHE) pode mediar o transporte de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias para o sistema nervoso central e pode promover neurodegeneração. Algumas regiões cerebrais do Sistema Límbico (SL) e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) expressam níveis aumentados de concentrações de norepinefrina (NE) e níveis diminuídos de ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina (5-HT), dopamina (DPM) e glutamato (GLU). O agonismo dos receptores noradrenérgicos, glutamatérgicos, gabaérgicos e monoaminérgicos induz cascatas bioquímicas que ativam a proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB), o principal fator de transcrição responsável pela regulação da expressão gênica no condicionamento do medo de longa memória. TRP, Tryptofano; GH, hormônio do crescimento; TNF- α , Fator- α de Necrose Tumoral; IFN- γ , Interferon Gama; IL-1 β , Interleucina-1- β ; IL-6, Interleucina-6; GPX, Glutathione Peroxidase; SOD, Superóxido Dismutase. Fonte: Adaptado de Gomes, Crispim e da Rosa (2025).

3.3.1 Desafios da terapia farmacológica do TEPT

As manifestações clínicas complexas do TEPT variam de acordo com o perfil dos sintomas, e apresentam desafios adicionais ao diagnóstico e ao tratamento. As diretrizes internacionais atuais recomendam tratamentos farmacológicos projetados para outros transtornos psiquiátricos, como antidepressivos (Marazziti et al., 2023).

As recomendações baseiam-se em evidências desatualizadas e não abordam sintomas críticos, como distúrbios do sono (Marazziti et al., 2023).

Adicionalmente, o alto índice de abandono terapêutico, a estigmatização social e a limitada resposta terapêutica reforçam a urgência por tratamentos mais eficazes e personalizados (Thompson-Hollands et al., 2019; Mittal et al., 2013; Marazziti et al., 2023). A ineficácia relativa das opções atuais impulsiona a busca por novas abordagens que atuem diretamente nos mecanismos moleculares e nos circuitos neurais envolvidos na consolidação e extinção de memórias traumáticas.

Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRSs), incluindo paroxetina, fluoxetina e sertralina, são comumente prescritos (Marazziti et al., 2023). Embora moderadamente eficazes no alívio de sintomas depressivos e relacionados à ansiedade, os ISRSs frequentemente falham em tratar os principais sintomas do TEPT, como pesadelos e hiperexcitabilidade (Marazziti et al., 2023). Além disso, seus efeitos colaterais, incluindo disfunção sexual, distúrbios do sono e alterações de peso, podem persistir por muito tempo após a interrupção do tratamento, representando desafios para a adesão a longo prazo (Marazziti et al., 2023).

Alternativas terapêuticas emergentes, como terapias assistidas por psicodélicos, são promissoras para lidar com as limitações dos tratamentos convencionais. Ensaio clínicos randomizados demonstraram a eficácia da psicoterapia assistida por 3,4-Metilenodioximetanfetamina (MDMA, do inglês *3,4-Methylenedioxymethamphetamine*) na redução da gravidade dos sintomas de TEPT, na melhora da resiliência psicológica e no alívio de comprometimentos funcionais, particularmente em casos graves (Mitchell et al., 2024; Yang et al., 2024). Estudos da Associação Multidisciplinar para Estudos Psicodélicos (MAPS) destacaram ainda mais a segurança e a superioridade da psicoterapia assistida por MDMA em relação às opções farmacológicas tradicionais, como sertralina e paroxetina (Feduccia et al., 2019).

Tratamentos à base de canabinoides também estão ganhando atenção por seu papel no manejo do TEPT. O óleo de canabidiol (CBD) demonstrou efeitos ansiolíticos, particularmente na redução das respostas de medo e na melhora da regulação emocional durante a recordação de memórias traumáticas (Bolsoni et al., 2022). A expressão de receptores canabinoides em regiões cerebrais importantes, como o córtex pré-frontal medial (CPFm), o hipocampo (HPC) e a amígdala, ressalta

seu papel potencial na modulação das respostas aprendidas de medo e estresse (Telch et al., 2022).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo *in silico*

4.1.1 Tratamento das estruturas 4XZP, 4TLL e 6VMS

Para investigar o nível de afinidade da interação entre a Galectina-4 e o receptor glutamatérgico do tipo NMDA, inicialmente identificou-se no Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*): a estrutura cristalina do domínio N-terminal da Galectina-4 humana (PDB ID: 4XZP) e a estrutura cristalina das subunidades GluN1/GluN2B do receptor ionotrópico glutamatérgico NMDA (PDB ID: 4TLL). Identificou-se a sequência FASTA para definição das cadeias de aminoácidos presentes em cada proteína. Através do *software* QuimeraX 1.9, selecionou-se resíduos não padronizados da 4XZP e 4TLL, e em seguida foram deletados os átomos e cadeias de hidrogênio, a fim de buscar uma interação mais próxima da nativa. No caso da subunidade 4TLL, foram excluídas as cadeias A e C, pertencentes à subunidade GluN1, e permaneceram as cadeias B e D que pertencem à GluN2B, subunidade envolvida na consolidação de memória de longo prazo em uma série de estudos (Halt et al., 2012; Sun et al., 2016; Mikics et al., 2017).

Para investigar o nível de afinidade da ligação entre Galectina-4 e o receptor dopaminérgico D2, primeiro identificou-se no PDB a estrutura cristalina do domínio N-terminal da Galectina-4 humana (PDB ID: 4XZP) e a estrutura de um complexo receptor-de-proteína-G dopamina D2 em uma membrana lipídica (PDB ID: 6VMS). Em seguida, selecionou-se resíduos não padronizados da estrutura 4XZP e foram deletados os átomos e cadeias de hidrogênio, através do *software* QuimeraX 1.9. A estrutura 6VMS não apresentou resíduos não padronizados. A cadeia “A” da estrutura 6VMS teve que ser renomeada cadeia “P” no ClusPro, devido a um problema de não distinção de cadeias igualmente nomeadas e de diferentes estruturas, pelo PDBsum.

4.1.2 Docking molecular das estruturas 4XZP-4TLL e 4XZP-6VMS

Após o tratamento das proteínas 4XZP, 4TLL e 6VMS, descrito anteriormente, foi feito um docking molecular proteína-proteína através do web servidor ClusPro 2.0, para investigar o nível de afinidade da ligação entre duas interações: 4XZP-4TLL e 4XZP-6VMS. Esse programa atua por meio de três etapas principais: (i) encaixe de corpo rígido a partir de uma amostragem exaustiva de bilhões de espaços conformacionais; (ii) agrupamento baseado no desvio quadrático médio (RMSD) das 1.000 estruturas de menor energia geradas, para encontrar os maiores agrupamentos que representarão os modelos mais prováveis do complexo; e (iii) refinamento de estruturas selecionadas usando minimização de energia (Kozakov et al., 2017). Para esse estudo, os complexos mais bem acoplados das interações são identificados com base na menor pontuação ponderada (do inglês, *Weighted Score*) de energia e eficiência de acoplamento (Kozakov et al., 2017).

Dentre os principais parâmetros analisados pelo ClusPro estão: a) Cluster: identifica um grupo específico de conformações (poses) similares dentro da ancoragem realizada; b) *Weighted Score*: O menor valor (mais negativo) do coeficiente de ponderação sugere uma interação energeticamente mais favorável; c) Membros: representa o número de poses de docking incluídas nesse cluster; d) Centro: refere-se à energia da pose central no cluster; e) Menor energia: refere-se à energia mais baixa encontrada dentro do cluster. O tamanho de cada cluster representa a largura do poço de energia correspondente e fornece algumas informações sobre as contribuições entrópicas para a energia livre (Kozakov et al., 2017). Quanto maior o tamanho do cluster, maior a frequência de conformações e maior a probabilidade de representação mais próxima da realidade.

O web servidor ClusPro baseia-se no algoritmo de encaixe denominado PIPER, que realiza a amostragem de conformações (Kozakov et al., 2017). O centro de massa do receptor é fixado na origem do sistema de coordenadas, e as possíveis posições rotacionais e translacionais do ligante são avaliadas no nível de discretização fornecido (Kozakov et al., 2017). O espaço rotacional é amostrado em uma grade baseada em esferas, que define uma subdivisão de uma superfície esférica na qual cada pixel cobre a mesma área de superfície que todos os outros pixels (Kozakov et al., 2017). São consideradas 70.000 rotações que correspondem a ~ 5 graus em termos dos ângulos de Euler (Kozakov et al., 2017). O tamanho do

passo da grade translacional é de 1 Å (Kozakov et al., 2017). Para uma proteína de tamanho médio, isso equivale à amostragem de 10^9 – 10^{10} conformações (Kozakov et al., 2017).

4.1.3 Análise da qualidade estereoquímica do docking molecular das estruturas 4XZP-4TLL e 4XZP-6VMS

A qualidade do modelo de ambas interações preditas foi vista pelo PDBSum. A visualização dos modelos foi feita pelo PyMol 2.6. Para melhor caracterização estrutural das macromoléculas, o PDBsum fornece o Gráfico de Ramachandram com o *software* PROCHECK. O Gráfico de Ramachandram é uma das ferramentas mais antigas, simples, sensíveis e confiáveis para avaliar a qualidade estereoquímica de um modelo proteico a partir da medição de sua precisão estrutural (Elslinger e Wilson, 2012; Rai e Rieder, 2012). Esta análise exhibe os ângulos de torção Psi (ψ) vs. Phi (ϕ) da cadeia principal para cada resíduo de aminoácido (Elslinger e Wilson, 2012). Os resíduos tendem a se agrupar em certas regiões favorecidas e são excluídos de certas regiões não permitidas, principalmente devido ao impedimento estérico entre os átomos C β da cadeia lateral e da cadeia principal (Elslinger e Wilson, 2012). Glicina e Prolina apresentam distribuições diferentes de outros resíduos no gráfico, onde as regiões favorecidas são duplicadas devido à ausência de uma cadeia lateral para Glicina, e o ângulo ϕ é altamente restrito à aproximadamente -60° para Prolina (Elslinger e Wilson, 2012). As regiões favorecidas correspondem às estruturas secundárias regulares e são agrupadas em três regiões principais: (1) conformação estendida (como fitas β) agrupam-se no quadrante superior esquerdo, (2) hélices destrás agrupam-se no topo do quadrante inferior esquerdo e (3) hélices canhotas na parte inferior do quadrante superior direito. Todos os outros resíduos em estruturas menos regulares também devem estar dentro dessas regiões favorecidas.

4.2 Modelo *in vitro*

4.2.1 Cultura de neuroblastoma

Foram escolhidas células não diferenciadas da linhagem SH-SY5Y, devido a sua alta expressão de marcadores de imaturidade celular e à diversidade de estudos que indicam potencial ação reguladora da Gal-4 em estágios imaturos de células gliais e neuronais durante o desenvolvimento do SNC (Shipley, Mangold e Szpara, 2016; Stancic et al., 2012; de Jong et al., 2018). Além disso, as células da linhagem SH-SY5Y apresentam marcadores moleculares observados em neurônios dopaminérgicos antes de sua diferenciação, mesmo sendo compreendido que a diferenciação com ácido retinóico aumenta a expressão de vários marcadores incluindo o receptor dopaminérgicos do tipo D2 e glutamatérgicos do tipo NMDA (Lopes et al., 2017; Wang et al., 2025). A manipulação dessa cultura permitiu a expansão em larga escala antes da diferenciação, com relativa facilidade e baixo custo (Shipley, Mangold e Szpara, 2016; Feles et al., 2022).

Toda a linhagem celular foi cultivada em placa de poliestireno de 24 poços com meio de cultura DMEM-F12 HEPES (Invitrogen Ref 12400-024), enriquecidos com PBS-glicose 30%, vitaminas, aminoácidos, antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Sigma). A troca do meio de cultura com confluência de 85-90%, ocorreu na sala de cultura de células indiferenciadas no Núcleo de Inovação Terapêutica (NUPIT-SG), a cada 48 horas, onde durante este período, a cultura celular permaneceu em estufa, à 37 °C em atmosfera controlada de 5% de CO₂.

4.2.2 Drogas administradas

Na cultura de neuroblastoma foram administradas as seguintes drogas com específicas concentrações:

- a) o Muscimol (10 µM) (Marty et al., 1996) é um agonista de subtipos de receptores de GABA-A (ácido gama-aminobutírico do tipo A), para diminuir estímulos neurológicos ou a atividade neuronal, reduzindo a excitabilidade neuronal;
- b) a Picrotoxina (PTX) (100 µM) (Otmakhov et al., 2004) atua como antagonista dos receptores de GABA_A, e induz ativação sináptica, aumentando a excitabilidade neuronal;

c) o APV (10 μ M) (Sher et al., 1991) é um inibidor seletivo de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e bloqueia esses receptores, reduzindo a excitabilidade neuronal;

d) a Eticloprida (1 μ M) (Zhu et al., 2012) é um antagonista de receptores dopaminérgicos D2 e bloqueia esses receptores;

e) anticorpo anti-Gal-4 (0,5 μ g/ μ L) foi administrado com o objetivo de bloquear a ação da Galectina-4 endogenamente.

4.2.3 Design experimental

Análise do efeito da Gal-4 na atividade neuronal

Para analisar o nível de expressão Gal-4 após estímulo ou inibição neuronal, e antagonismo de receptores glutamatérgicos e dopaminérgicos, as células da cultura de neuroblastoma foram pré-tratadas com drogas por 24 horas. Esse tempo de tratamento foi estabelecido após a realização de ensaios preliminares que permitiram padronizar a concentração das drogas e de parâmetros de meios de cultivo de neuroblastoma. Essas células foram divididas em 5 grupos experimentais para investigar o efeito de galectina 4 em processos relacionados à plasticidade sináptica:

- A) Grupo Controle: não foi administrado nenhuma droga ou anticorpo;
- B) Grupo Muscimol: o Muscimol foi administrado para inibir a atividade neuronal;
- C) Picrotoxina: Picrotoxina foi administrada para ativar atividade neuronal;
- D) Grupo Eticloprida: Eticloprida foi administrada para antagonizar os receptores dopaminérgicos D2;
- E) Grupo APV: APV foi administrado para antagonizar os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA;

Após 24 horas de tratamento com as drogas farmacológicas, as células foram submetidas à imunocitoquímica, onde identificou-se e quantificou-se a expressão da Gal-4 nos grupos.

Análise do efeito do bloqueio da Gal-4 na expressão do CREB

Para analisar se o bloqueio de Gal-4 endógena altera a expressão do fator de transcrição necessário a plasticidade sináptica e aprendizado, CREB, após inibição ou estimulação sináptica, com ou sem bloqueio de Gal-4, as células da cultura de neuroblastoma foram pré-tratadas com drogas e com o anticorpo anti-Gal-4, para bloqueio da Gal-4. Essas células foram divididas em 6 grupos experimentais:

- A) Grupo Controle: não foi administrado nenhuma droga ou anticorpo;
- B) Grupo Muscimol: foi administrado Muscimol para inibir a atividade neuronal, e não houve bloqueio da Gal-4;
- C) Grupo Picrotoxina: foi administrada a Picrotoxina para excitar a atividade neuronal, e não houve bloqueio da Gal-4;
- D) Grupo Controle com bloqueio da Gal-4: administrou-se o anticorpo anti-Gal-4 para bloqueio endógeno da Gal-4;
- E) Grupo Muscimol com bloqueio da Gal-4: foi administrado Muscimol para inibir a atividade neuronal, e administrou-se o anticorpo anti-Gal-4 para bloqueio endógeno da Gal-4;
- F) Grupo Picrotoxina com bloqueio da Gal-4: foi administrada a Picrotoxina para excitar a atividade neuronal, e administrou-se o anticorpo anti-Gal-4 para bloqueio endógeno da Gal-4;

Após 24 horas de tratamento dos grupos experimentais de acordo com suas condições estabelecidas, as células foram fixadas com Paraformaldeído 4% e seguiu-se com os experimentos de ICC com uso de anticorpo anti-pCREB para sua identificação e quantificação.

4.2.4 Imunocitoquímica (ICC)

Após realizados os tratamentos farmacológicos, os neurônios de cultura de neuroblastoma foram fixados com paraformaldeído a 4% (PFA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS), permeabilizados em Triton X-100 a 0,1% em PBS, por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi realizado o bloqueio por 1 hora com PBS/BSA 1%. Nesse tempo, foi montada a câmara úmida e preenchida com água destilada. Incubou-se 50µl de solução com o anticorpo primário em cada poço da placa, deixado em geladeira a 4°C, overnight.

No dia seguinte: Lavou-se 3x com 100µl de PBS/BSA 0,5% por 10 minutos, cada vez. Preparou-se os anticorpos secundários fluorescentes (diluídos em PBS/BSA 5%) – no escuro e com papel alumínio, para incubar separadamente (preparou-se cada um apenas na hora de incubar). Incubou-se com o anticorpo secundário no escuro, em câmara úmida, por 1 hora à temperatura ambiente, cada. Então, lavou-se duas vezes com PBS/BSA 0,5% por 10 minutos cada vez. Incubou-se com 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) diluído em PBS/BSA 5% na por 15 minutos no escuro. Lavou-se duas vezes com PBS/BSA 0,5% por 10 minutos cada vez. Guardou-se a placa envolta em papel alumínio dentro da câmara úmida na geladeira a 4°C, para no outro dia fotografar cada poço através de um tablet conectado ao microscópio óptico invertido de imunofluorescência (Nikon Eclipse-TS2).

Foram utilizados como anticorpos primários anti-Galectina-4 (1:75, sc-729, Santa Cruz Biotechnology) para detecção da Gal-4, o anti-Phospho-CREB (1:100; p00577-1, Boster Bio) para detecção do CREB, a anti-β-Actina (1:400, sc-376421, Life) para identificação do nível de integridade da morfologia celular. Quanto aos anticorpos secundários administrados, incluiu-se o anti-mouse (1:1000) e anti-rabbit (1:400) e DAPI (1:500; Sigma) para identificação do núcleo da célula.

A análise quantitativa dos neurônios da cultura submetidos ao ICC, foi feita através de um microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse Ts2), equipado com um sistema de LEDS para excitar fluoróforos, nas cores azul (470 nm), verde (525 nm) e violeta (385 nm). Os neurônios da cultura de neuroblastoma foram selecionados aleatoriamente. Fotografou-se de dois a três campos por poço de acordo com cada grupo experimental na lente objetiva de 10X. O tempo de exposição escolhido para a análise do DAPI foi de 30ms, e de 1.5s para a Gal-4 e CREB. O ganho de campo foi de 240 para o DAPI, 280 para a Gal-4 e CREB, e 680-800 para a beta-actina.

Para quantificar a densidade celular a partir das imagens obtidas por imunocitoquímica, foi necessário determinar a área correspondente a cada campo de visão analisado. As imagens foram adquiridas utilizando objetiva de 10x, totalizando uma resolução média de 1770 × 1180 pixels por imagem. A escala da imagem foi determinada com base nas informações extraídas do *software* ImageJ. Ao utilizar a ferramenta "Set Scale", foi identificado que a imagem apresenta uma resolução de 144 pixels por polegada (pixels/polegada). Sabendo que 1 polegada equivale a 25,4 milímetros (mm), a escala foi convertida a partir do seguinte cálculo:

$$25,4 \text{ mm}/144 \text{ pixels} \approx 0,1764 \text{ mm/pixel} = 176,4 \text{ } \mu\text{m/pixel}$$

Com essa escala, foi possível estimar as dimensões físicas da imagem:

- Largura:
 $1770 \text{ pixels} \times 0,1764 \text{ } \mu\text{m/pixel} \approx 312 \text{ } \mu\text{m}$
- Altura:
 $1180 \text{ pixels} \times 0,1764 \text{ } \mu\text{m/pixel} \approx 208 \text{ } \mu\text{m}$

Assim, a área total de cada campo de visão foi estimada em:

$$312 \text{ } \mu\text{m} \times 208 \text{ } \mu\text{m} = 64.896 \text{ } \mu\text{m}^2 = 0,0649 \text{ mm}^2$$

Para fins de análise, foram selecionadas múltiplas imagens por poço. Supondo a análise de 3 imagens por poço, a área total amostrada por poço seria:

$$3 \times 0,0649 \text{ mm}^2 = 0,1947 \text{ mm}^2$$

Os experimentos foram conduzidos em placas de 24 poços, cuja área útil de cada poço é de aproximadamente 191 mm². A fração da área do poço efetivamente amostrada foi, portanto:

$$0,1947/191 \times 100 \approx 0,10\% \text{ de área total de amostragem}$$

As imagens de neurônios de acordo com seus grupos experimentais foram feitas em sequência, com as mesmas configurações de tempo de exposição e ganho de campo. Em seguida, as análises de imagem foram feitas através do *software* ImageJ (<https://imagej.net/ij/>), onde foi gerado o Valor Médio Cinza (do inglês *Mean Gray Value*), que é a média aritmética das intensidades de pixels dentro de cada área selecionada que é definida por outros autores como região de interesse (ROIS, do inglês *Region of Interest*) (Karpova et al., 2013; Melgarejo da Rosa et al., 2016). O limiar determinado pela coloração DAPI foi utilizado para definir ROIs nucleares, e posteriormente aplicados para a coloração Gal-4 e CREB. Foram excluídas da seleção: debris celulares, células pixeladas e células com superexpressão de marcação. A partir da média gerada pelo ImageJ, foi calculado o Índice de Imunoreatividade (IR), sendo a Média gerada pelo GraphPad Prism (versão 9.3). Os dados para ambos os alvos proteicos foram normalizados e descritos como desvios

percentuais da média de acordo com o Grupo Controle sem bloqueio da Gal-4. Os valores foram normalizados de acordo com pelo menos dois experimentos independentes, com duplicatas para cada condição experimental. Aplicou-se o teste de análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Kruskal-Wallis, para os dados não paramétricos. A análise do poder estatístico dos dados foi feita pelo *software* G*Power, e está descrita no material suplementar S9.

4.2.5 Isolamento de RNA e síntese do cDNA

Após tratamentos em células de neuroblastoma, a extração de RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol®, conforme protocolo padronizado. O meio de cultura foi retirado e nas células de neuroblastoma foram adicionados 700 µL de Trizol® para lisar células e inativar RNases. A mistura foi homogeneizada por pipetagem repetida para promover a lise celular por força mecânica. Em seguida, a amostra foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos para garantir a dissociação completa dos complexos proteicos nucleares. Posteriormente, foram adicionados 150 µL de clorofórmio, e o tubo foi agitado vigorosamente por 20 segundos, seguido de uma nova incubação em temperatura ambiente por 3 minutos. A separação das fases foi realizada por centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo. Para precipitação do RNA, foram adicionados 375 µL de isopropanol a 100%, seguido de homogeneização e incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. A amostra foi então centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, resultando em um pellet esbranquiçado de RNA. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, e o pellet lavado com 750 µL de etanol a 75%, seguido de breve vortexação e nova centrifugação a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O etanol residual foi descartado, e o pellet foi deixado para secar em temperatura ambiente por 10 minutos. Após a evaporação completa do etanol, o RNA foi ressuspensão em 30 µL de água livre de RNase. O tubo foi incubado em banho-maria a 55°C por 10 a 15 minutos. Por fim, a concentração e a pureza do RNA extraído foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop, e as amostras foram armazenadas a -80°C até o uso.

O cDNA obtido foi utilizado para amplificação gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Os primers das sequências *Forward* (F) e *Reverse* (R) de cada gene-alvo estão descritos abaixo:

A) LGALS4

F- CACAGCTCGAAGAACCATCA

R- CAGCGAATGGACAGATCAAA

B) c-Fos

F- CCGAGCTGGTGCATTACAGA

R- CGCACAGATAAGGTCCTCCC

C) GluN2B

F- CCTGGGAGCAGAAGCAGTAT

R- AGATTTCTCTGCACACCCTG

D) Dopamine receptor (D2)

F-CGAGTCAACACCAAACGCAG

R- TCCTCGGGGTGAGTACAGTT

E) Arc

FOR: 5'-CTGAGCCACCTAGAGGAGTACT-3'

REV: 5'-AACTCCACCCAGTTCTTCACGG-3

4.3 Modelo *in vivo***4.3.1 Animais**

Foram utilizados ratos adultos da espécie *Rattus norvegicus* do sexo biológico macho com idade entre [OBJ]6-8[OBJ] semanas, com peso de [OBJ]150-200kg. Os experimentos apenas foram conduzidos após aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo 0079/2023. Os animais foram providos de Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. Esses animais foram mantidos em um biotério apresentando uma temperatura constante de 22 a 27°C, com livre acesso a água e comida. Os roedores foram submetidos a um ciclo de 12 em 12 horas de exposição e retirada da luminosidade. Todas as manipulações foram realizadas durante a fase de luz do ciclo. A equipe fez

o necessário para cumprir o que cita a diretriz legal brasileira Lei no 11.794/2008, acerca da adoção de medidas que causem o mínimo de desconforto ou sofrimento de animais vivos submetidos a procedimentos experimentais. Os experimentos foram realizados estritamente de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). 20 animais foram utilizados no total, 10 no grupo controle e 10 no grupo tratado.

4.3.2 Cirurgia para implante de cânulas intra-hipocampal

Os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para implantação de cânulas intra-hipocampo — região cerebral necessária para consolidação de memórias. Após 7 dias de recuperação cirúrgica, os animais foram testados no teste de medo condicionado contextual para análise da influência de Galectina-4 na consolidação de memória traumática.

Para o procedimento cirúrgico, os roedores foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 50mg/kg de cloridrato de cetamina e 5mg/kg de xilazina. Posicionou-se os animais em um aparelho estereotático e foi feita a incisão da pele e limpeza do crânio. Após isso, cânulas guia de calibre 27 foram colocadas unilateralmente via intra-hipocampo. As coordenadas do aparelho estereotático para as regiões CA1 do hipocampo seguiram as coordenadas do atlas Paxinos e Watson (1986): dorsal foram AP: -2mm do bregma; L: $\pm 1,6$ da sutura sagital; V: -1,5mm da superfície do crânio. As cânulas-guia foram fixadas com acrílico dental. Foram inseridos estiletes de aço inoxidável (calibre 30) nas cânulas-guia para mantê-las livres de detritos. Todos os animais tiveram uma semana para se recuperar da cirurgia e o efeito de drogas anestésicas.

Para análise do envolvimento de Galectina-4 no processo de consolidação de memória, o anticorpo anti-Gal-4 (0,5 μ g/ μ L) foi administrado via intra-hipocampo imediatamente após a etapa de treinamento da tarefa de medo condicionado contextual.

Grupos experimentais:

- A) Grupo 1: Administrou-se solução salina via intra-hipocampo, imediatamente após o treino do medo. Realizou-se Teste de Medo Condicionado Contextual 24 horas depois.
- B) Grupo 2: Administrou-se anticorpo anti-Gal-4 (0,5µg/µL) via intra-hipocampo, imediatamente após o treino do medo. Realizou-se Teste de Medo Condicionado Contextual 24 horas depois.

4.3.3 Teste de medo condicionado contextual (TMCC)

O condicionamento clássico é uma forma de aprendizado associativo, descrito pelo fisiologista russo Ivan Pavlov como uma relação de aprendizado entre dois estímulos: a) o estímulo condicionado (EC), que relaciona-se ao contexto onde o traço de memória se formou, como por exemplo: luz, toque, tom; b) o estímulo incondicionado (EI), estímulo aversivo ou emocional que facilita a formação do traço de memória, como por exemplo: choque, recompensa ou omissão da mesma (Chang e Maren, 2009).

Baseado no condicionamento clássico descrito por Pavlov, o teste de medo condicionado contextual (TMCC) é um exemplo de teste *in vivo* que pode auxiliar no estudo da consolidação da memória traumática. O contexto é uma combinação sempre presente de elementos ambientais discretos capazes de influenciar vários processos psicológicos (Chaaya et al., 2019). Quando há uma associação entre um EC e EI, forma-se uma memória de medo contextual permanente, e compõe um parâmetro de formação de memórias aversivas (Chaaya et al., 2019). Esse teste produz uma resposta de medo condicionado ao estímulo contextual, na forma de *freezing* (do português, congelamento), sendo este o parâmetro de memória avaliado (percentagem de congelamento). Quanto maior a resposta de congelamento, mais forte a associação do EC com EI (Chang et al., 2009).

Conforme Gomes et al. (2010), o teste foi realizado em um aparato de treino (EC) formado por barras de metal no chão condutoras de corrente elétrica (EI). Nesse teste, houveram duas etapas gerais: treinamento do medo condicionado e análise de retenção da memória após 24 horas (Gomes et al., 2010). No treino, o roedor foi deixado livre para explorar o espaço do aparato por 3 minutos (EC). Depois, foram disparados três choques com uma corrente elétrica de 0,6 mA por 2 segundos, e 30 segundos de intervalo/choque (EI) (Gomes et al., 2010). Após o

último pareamento EI-EC, os animais permaneceram por 60 segundos antes de retornar a sua gaiola (Gomes et al., 2010).

As drogas (salina ou anticorpo anti-Gal-4) foram administradas imediatamente após o treino para análise do envolvimento de Gal-4 na consolidação da memória. A imobilidade completa (exceto para movimentos respiratórios), 24 horas após o treino, é indicativo de memória de medo dos animais (retenção EC-EI).

4.3.4 *Teste de Campo Aberto (TCA)*

Logo após o teste do TMCC os animais foram expostos ao Teste de Campo Aberto (TCA). O TCA é amplamente utilizado para avaliar o comportamento de exploração, nível de atividade locomotora e ansiedade em roedores. Ele fornece informações sobre o comportamento espontâneo e as respostas de medo ou ansiedade, dependendo das condições do ambiente. O teste é conduzido em uma caixa grande e aberta (geralmente de 50 x 50 cm a 100 x 100 cm de área, e 20 a 50 cm de altura) onde o chão é dividido em quadrantes ou zonas para monitoramento de movimentos dos animais. A quantidade de movimento ou *Crossing* (caminhadas entre os quadrantes, com as 4 patas) do animal é registrada, e pode ser uma medida da coordenação motora dos animais. As respostas de levantar dos animais (*Rearing*) é avaliado como uma medida da atividade ansiolítica dos animais, na qual reflete um mecanismo de fuga ou medo dos animais. O comportamento de *Crossing* e *Rearing* dos animais foi avaliado por um período de 5 minutos.

4.3.5 *Teste de Labirinto em Cruz Elevado (TLCE)*

Logo após o TCA os animais foram avaliados no Teste de Labirinto em Cruz Elevado (TLCE). O labirinto em cruz elevado é usado principalmente para avaliar a ansiedade em roedores, observando suas escolhas entre áreas abertas e fechadas. Ele é projetado para avaliar a tendência de fuga, medo e o comportamento de exploração. O labirinto é composto por uma plataforma elevada com formato de "mais" (+), que contém quatro braços, sendo dois fechados (com paredes) e dois abertos (sem paredes). Cada braço tem aproximadamente 30 cm de comprimento e 5 cm de largura. A plataforma é geralmente elevada a cerca de 50 a 80 cm do chão, o que confere um certo grau de medo devido à altura.

O roedor pode se sentir mais seguro nas áreas fechadas (com paredes) e mais ansioso nas áreas abertas (sem paredes). Isso permite medir a tendência do animal a explorar ou evitar áreas abertas. A quantidade de tempo que o roedor passa em cada tipo de braço (aberto ou fechado) pode indicar seu nível de ansiedade. Quanto mais o animal permanecer nos braços fechados, maior o nível de ansiedade. O tempo até o animal atravessar para um dos braços abertos ou sua preferência por áreas fechadas pode ser uma medida do medo do animal. Um maior tempo gasto nos braços abertos sugere menor nível de ansiedade. O contrário, maior permanência nos braços fechados, sugere um comportamento ansioso. O número de entradas em cada braço pode ser usado para avaliar o grau de exploração versus a evitação. O experimento também é conduzido por 5 minutos.

4.4 Análise estatística

As comparações entre os grupos experimentais *in vivo* foram feitas mediante Análise de Variância, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ou, quando entre dois grupos, pelo teste t de Student para amostras independentes. Dados não-paramétricos foram analisados pelo Mann-Whitney. Os valores considerados significativos apresentaram $p \leq 0,05$, de acordo com o GraphPad Prism (versão 9.3).

A quantificação relativa (RQ) dos dados da qPCR foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. A expressão dos genes CREB, Arc, c-Fos, GluN2B e receptor dopaminérgico D2, foi quantificada por qPCR e normalizada em relação ao gene de referência β -Actina.

5 RESULTADOS

5.1 Predição de afinidade da Galectina-4 pelo receptor glutamatérgico do tipo NMDA e pelo receptor dopaminérgico D2

Para analisar o nível de afinidade entre a Gal-4 e o receptor glutamatérgico do tipo NMDA e o receptor dopaminérgico D2, foi realizado um docking molecular proteína-proteína. Foram selecionadas estruturas cristalinas da Gal-4, dos

receptores NMDA (RNMDA) e dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 (RDD), expressas em espécie humana e com menor valor de resolução de comprimento em Ångströms (indicativo de maior qualidade estrutural), a fim de garantir maior precisão na determinação da posição atômica nas estruturas, e favorecer a acurácia do docking molecular (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização de proteínas selecionadas no PDB

Nome da proteína	PDB ID	Nome no PDB	Classificação	Método	Resolução
Galectina-4	4XZP	Estrutura cristalina do domínio N-terminal da Galectina-4 humana	Proteína de ligação de açúcar	Difração de Raios-X	1,48 Å
RNMDA	4TLL	Estrutura cristalina do receptor NMDA GluN1/GluN2B, estrutura 1	Proteína de sinalização	Difração de Raios-X	3,59 Å
RDD	6VMS	Estrutura de um complexo receptor-de-proteína-G dopamina D2 em uma membrana lipídica	Proteína de sinalização	Microscopia eletrônica	3,80 Å

Legenda: RNMDA, Receptor glutamatérgico do tipo NMDA; RDD, Receptor dopaminérgico D2.

Inicialmente, foi performada a interação 4XZP-4TLL, em que definiu-se a estrutura 4XZP como ligante e a subunidade 4TLL como receptor. Os esquemas de

pontuações do coeficiente de ponderação do acoplamento proteína-proteína foi feito de acordo com os seguintes modelos de energia: (i) balanceado, (ii) eletrostático-favorecido, (iii) hidrofóbico-favorecido e (iv) *Van der Waals* + eletrostática (Tabela 2). Foi gerado um ranking de 29 modelos com coeficientes de ponderação para energia balanceada e eletrostática favorecida, 27 modelos para energia hidrofóbica e 29 modelos para *Van der Waals* + Eletrostática, que podem ser consultados respectivamente no material suplementar S1, S2, S3 e S4.

O ranking está em ordem decrescente quanto ao tamanho do cluster – estruturas com similaridade espacial – e reflete os centros de clusters mais povoados de estruturas de baixa energia acopladas. No modelo de acoplamento 4XZP-4TLL com maior número de conformações de energia balanceada – indicada para casos em que não têm-se estudos anteriores que informem quais forças eletrostáticas predominam o complexo de interação – foram encontradas 75 poses similares, com coeficiente ponderado de menor energia de -1029.5 (Tabela 2). O ranking está em ordem decrescente quanto ao maior número de poses e os menores coeficientes ponderados de energia de afinidade de ligação, nos clusters “0”, “1” e “3”, que foram descritos nas Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5.

A energia de afinidade da ligação é maior para a energia hidrofóbica, com coeficiente ponderado de menor energia de -1528.0 (Tabela 4), em comparação a energia eletrostática e de *Van der Waals* + eletrostática (Tabela 3 e Tabela 5).

Tabela 2 – Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-4TLL, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia balanceada

Cluster	Energia balanceada		
	<i>Poses</i>	Representativo	<i>Weighted Score</i>
0	75	Centro	-1029.5
		Menor energia	-1029.5
1	58	Centro	-929.2
		Menor energia	-995.1
2	57	Centro	-843.5
		Menor energia	-970.0

A tabela mostra o número de *poses* (o número de estruturas ancoradas), e o coeficiente de ponderação (*Weighted Score*) de acordo com a energia do centro do grupo (ou seja, a estrutura que possui o maior número de estruturas vizinhas no grupo) e o de menor energia de afinidade de ligação.

Tabela 3 – Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-4TLL, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia eletrostática favorecida

Cluster	Energia eletrostática favorecida		
	<i>Poses</i>	Representativo	<i>Weighted Score</i>
0	75	Centro	-1019.5
		Menor energia	-1019.5
1	58	Centro	-930.2
		Menor energia	-1049.5
2	57	Centro	-998.6
		Menor energia	-1011.8

Tabela 4 – Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-4TLL, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia hidrofóbica favorecida

Cluster	Energia hidrofóbica favorecida		
	<i>Poses</i>	Representativo	<i>Weighted Score</i>
0	75	Centro	-1528.0
		Menor energia	-1528.0
1	58	Centro	-1545.6
		Menor energia	-1545.6
2	57	Centro	-1321.6
		Menor energia	-1545.1

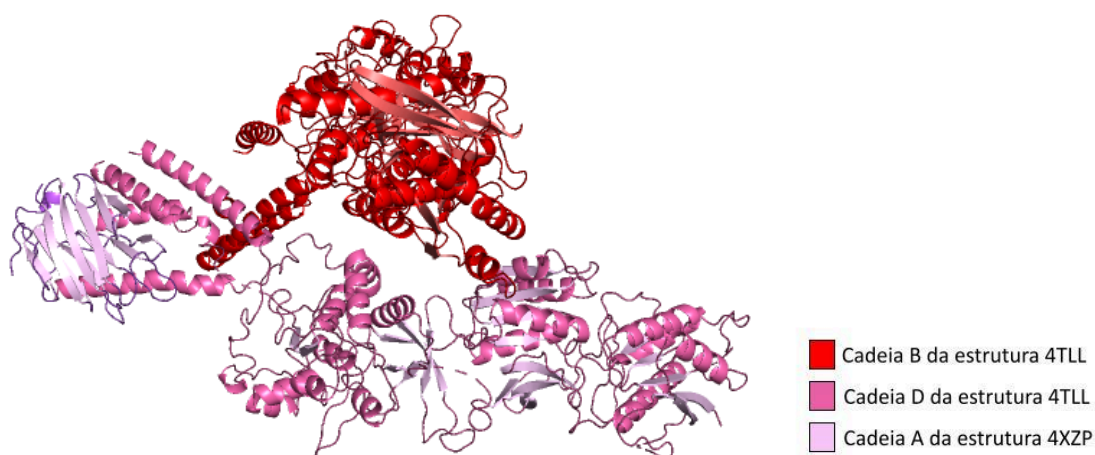
Tabela 5 – Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-4TLL, de acordo com pontuações ponderadas no modelo *Van der Waals* + eletrostática

Cluster	<i>Van der Waals</i> + eletrostática
---------	--------------------------------------

	<i>Poses</i>	Representativo	<i>Weighted Score</i>
0	75	Centro	-270.6
		Menor energia	-346.9
1	58	Centro	-302.7
		Menor energia	-321.1
2	57	Centro	-269.5
		Menor energia	-308.9

Em seguida, submeteu-se o modelo de docking molecular 4XZP-4TLL de maior energia de afinidade de ligação em meio de cargas elétricas balanceadas, ao PDBsum. Na Figura 12 é possível visualizar em 3D o modelo de encaixe de energia mais favorável entre as estruturas 4XZP e 4TLL.

Figura 12 – Visualização esquemática da estrutura em 3D da interação mais favorável entre a estrutura 4XZP e a subunidade 4TLL gerado pelo PDBsum, no modelo de energia balanceada

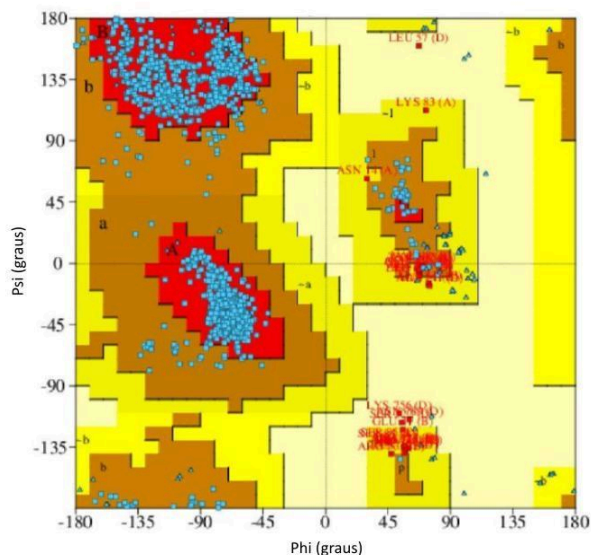


Fonte: autora com PyMOL.

Na Figura 13, é possível observar os dados visuais gerados pelo gráfico de Ramachandran, responsável por validar a qualidade estereoquímica da interação 4XZP-4TLL com base nos ângulos ϕ (Phi) e ψ (Psi) do esqueleto peptídico. É possível observar 1291 resíduos de um total de 1449 resíduos não-glicina e não-prolina, definidos como regiões mais favoráveis (em vermelho no gráfico), o que

representou um índice de 89.1% (VR: > 90%) (Tabela 6). Isso sugere adequada conformação dos ângulos ϕ e ψ na interação 4XZP-4TLL.

Figura 13 – Gráfico Ramachandran da interação entre as estruturas 4XZP e 4TLL



Cada ponto em azul ou vermelho indica um resíduo de aminoácido. Os espaços em vermelho indicam as regiões mais favoráveis a nível de energia de afinidade de ligação. Os espaços nas cores marrom e amarelo indicam regiões de interação menos favoráveis. Os espaços nas cores bege e branco indicam regiões não permitidas para ligações. Fonte: A autora com PDBsum.

Tabela 6 – Dados estatísticos do gráfico de Ramachandram através do PROCHECK

Classificação de regiões	Nº de resíduos	Porcentagem (%)
Mais favorecidas [A, B, L]	1291	89.1%
Adicionalmente permitidas [a, b, l, p]	131	9.0%
Generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	23	1.6%
Não permitidas [XX]	4	0.3%
Resíduos não-Glicina e não-Prolina	1449	100.0%
Resíduos terminais (com exclusão de Glicina e Prolina)	27	-

Resíduos de Glicina	106	-
Resíduos de Prolina	61	-
Número total de resíduos	1643	-

Com base na análise de 118 estruturas com resolução de pelo menos 2,0 Å e fator R não superior a 20,0, espera-se que um modelo de boa qualidade tenha mais de 90% nas regiões mais favorecidas [A,B,L]. Legenda: [A], indica região em que localizam-se as hélices- α ; [B], região em que localizam-se as folhas- β ; [L], indica região em que localizam-se as hélices levóginas; [a], indica região ao redor da hélice α , mas um pouco mais distante dos valores ideais; [b], indica região menos favorecida ao redor das folhas- β ; [I], indica região menos favorecida ao redor das hélices levóginas; [p], indica pequena região permitida associada a algumas conformações irregulares ou loops; [~], indica conformações não estereoquimicamente ideais; [XX], indica áreas de incompatibilidade geométrica; -, valor não fornecido. Fonte: A autora com PDBsum.

A análise dos fatores G, medida de não-usualidade geométrica local de angulações e distâncias entre átomos, do modelo de interação 4XZP-4TLL, foi visto um índice de -0.19 (VR: $S < -0.5$, incomum; $S < -1.0$, extremamente incomum) (Tabela 7), sugere geometria local normal, sem significativas distorções.

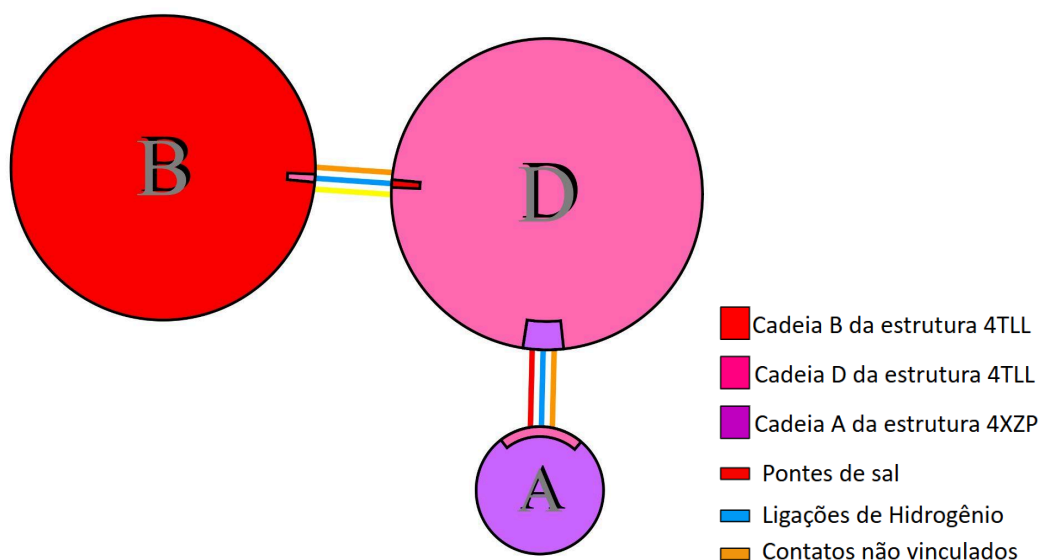
Tabela 7 – Fatores-G do gráfico de Ramachandram através do PROCHECK

Parâmetro		Score (S)	Média do Score	Média geral
Ângulo diedro	Distribuição Phi-Psi	-0,15	-0,19	-0,01
	Distribuição Chi1-chi2	-0,85*		
	Somente Chi1	-0,29		
	Chi3 e Chi4	0,43		
	Ômega	0,00		
Forças covalentes da cadeia principal	Comprimentos de ligação da cadeia principal	0,66	0,20	
	Ângulos de ligação da cadeia principal	-0,13		

Os fatores G indicam o nível de uma propriedade físico-química ser incomum, ou fora do comum. Classificação: $S < -0,5^*$ é incomum; $S < -1,0^{**}$ é altamente incomum. Observação importante: Os comprimentos de ligação da cadeia principal e os ângulos de ligação são comparados com os valores ideais de Engh & Huber (1991) derivados de dados de moléculas pequenas. Portanto, estruturas refinadas usando diferentes restrições podem apresentar desvios aparentemente grandes da normalidade. Fonte: A autora com PDBsum.

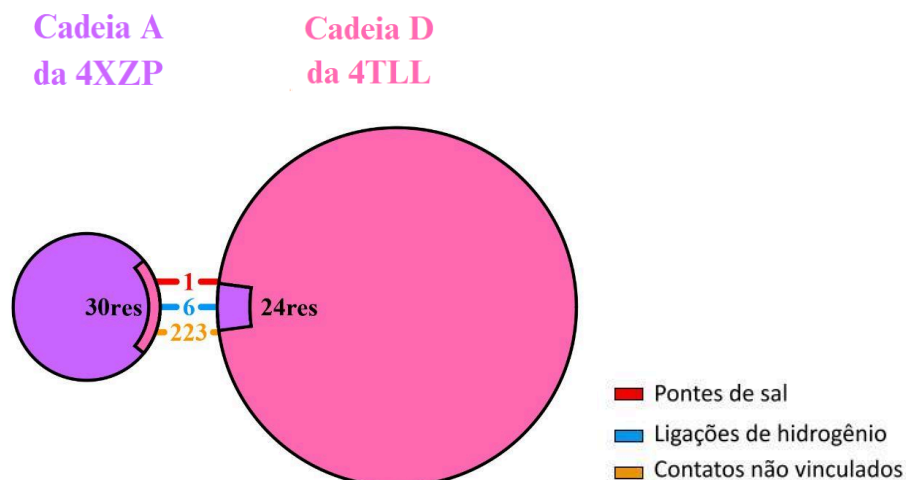
É possível observar que a cadeia A da subunidade 4XZP interage com a cadeia D da subunidade 4TLL. Observa-se que essa interação pode ocorrer através de 1 ponte de sal e 6 ligações de Hidrogênio (Figura 14 e 15). A análise estatística da interface das cadeias A e D pode ser vista na Tabela 8.

Figura 14 – Esquema visual dos tipos de cadeias e de ligações na interação entre a subunidade 4XZP da Gal-4 e a subunidade 4TLL do receptor glutamatérgico do tipo NMDA



É possível observar que a cadeia A da subunidade 4XZP, interage com a cadeia D da estrutura 4TLL, e não com a cadeia B. Fonte: A autora com PDBsum.

Figura 15 – Diagrama esquemático visual de interações entre a estrutura 4XZP e a subunidade 4TLL



Interface proteína-proteína das cadeias A da estrutura 4XZP e D da estrutura 4TLL. É possível observar que 30 resíduos da cadeia A interagem com 24 resíduos da cadeia D. A interação entre a cadeia A e a cadeia D se dá a partir de 1 ponte de sal e 6 ligações de hidrogênio. Há 223 contatos não vinculados. A área de cada círculo é proporcional a superfície da área que corresponde à cadeia proteica. Fonte: A autora com PDBsum.

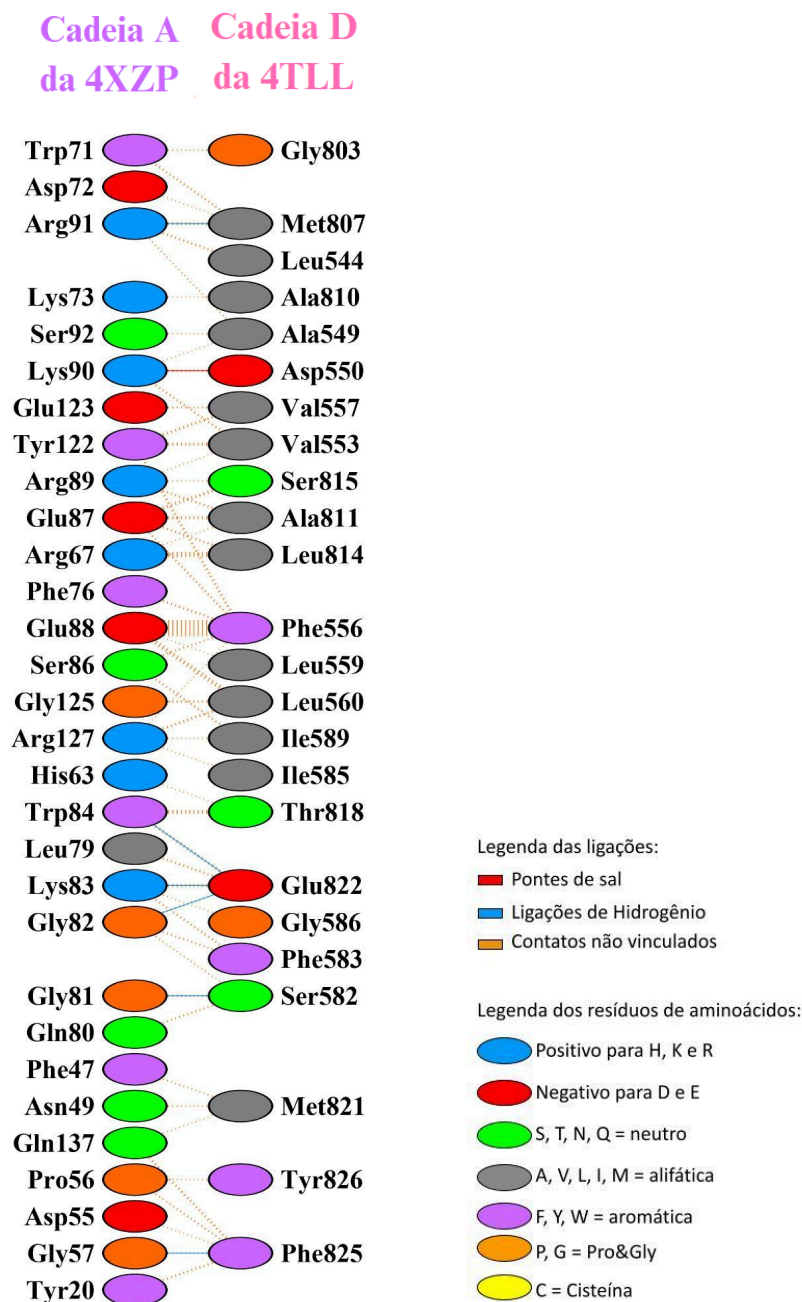
Tabela 8 – Análise estatística da predição da interação entre as cadeias A e D

Estrutura	Cadeia proteica	Nº de resíduos na interface	Área da interface (Å²)	Nº de pontes de sal	Nº de pontes dissulfeto	Nº de pontes de hidrogênio	Nº de contatos não-vinculados
4XZP	A	30	1468	1	-	6	223
4TLL	D	24	1695				

Legenda: -, ausência de ligação. Fonte: autora com PDBsum.

Na Figura 16 e Tabela 9 estão descritas as interações entre resíduos de aminoácidos da cadeia A da estrutura 4XZP e da cadeia D da subunidade 4TLL.

Figura 16 – Esquema visual das interações entre os resíduos aminoácidos das cadeias A e D



Legenda d: H, Histidina; K, Lisina; R, Arginina; D, Ácido Aspártico; E, Ácido Glutâmico; S, Serina; T, Treonina; N, Asparagina; Q, Glutamina; A, Alanina; V, Valina; L, Leucina; I, Isoleucina; M, Metionina; F, Fenilalanina; Y, tirosina; W, Triptofano; P, Prolina; G, Glicina. Fonte: A autora com PDBsum.

Tabela 9 – Interações entre aminoácidos das cadeias A e D e principais propriedades físico-químicas

Aminoácidos da cadeia A da estrutura	Propriedade de	Aminoácidos da cadeia D da subunidade	Propriedade de	Tipo de ligação química da interação

4XZP		e 4TLL		
Lys90	Carga elétrica positiva	Asp550	Carga elétrica negativa	Ponte de sal
Arg91	Carga elétrica positiva	Met807	Cadeia alifática	Ligação de Hidrogênio
Trp84	Aromática	Glu822	Carga elétrica negativa	Ligação de Hidrogênio
Lys83	Carga elétrica positiva	Glu822	Carga elétrica negativa	Ligação de Hidrogênio
Gly82	Pro&Gly	Glu822	Carga elétrica negativa	Ligação de Hidrogênio
Gly81	Pro&Gly	Ser582	Aminoácidos polares, mas não carregados	Ligação de Hidrogênio
Gly57	Pro&Gly	Phe825	Cadeia aromática	Ligação de Hidrogênio

Fonte: A autora com PDBsum.

Em seguida, para análise da energia de afinidade da interação 4XZP-6VMS, estabeleceu-se a estrutura 4XZP como ligante e a estrutura 6VMS como receptor. O docking proteína-proteína resultou num ranking decrescente de 26 modelos de energia balanceada, energia hidrofóbica e 29 modelos para *Van der Waals* + Eletrostática, que podem ser consultados respectivamente no, que podem ser consultados no material suplementar S5, S6, S7 e S8. No modelo de acoplamento de interação 4XZP-6VMS de energia balanceada, foram encontradas 158 poses similares, com um coeficiente ponderado de menor energia de -818.3 (Tabela 8). O ranking está em ordem decrescente quanto ao maior número de poses e os menores coeficientes ponderados de energia de afinidade de ligação nos clusters

“0”, “1” e “3”, foram descritos nas Tabela 8, Tabela 10, Tabela 11, Tabela 12 e Tabela 13.

Tabela 10 – Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-6VMS, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia balanceada

Cluster	Energia balanceada		
	<i>Poses</i>	Representativo	<i>Weighted Score</i>
0	158	Centro	-659.2
		Menor energia	-818.3
1	105	Centro	-646.4
		Menor energia	-873.9
2	74	Centro	-712.4
		Menor energia	-712.4

A tabela mostra o número de *poses* (o número de estruturas ancoradas), e o coeficiente de ponderação (*Weighted Score*) de acordo com a energia do centro do grupo (ou seja, a estrutura que possui o maior número de estruturas vizinhas no grupo) e o de menor energia.

Tabela 11 – Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-6VMS, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia eletrostática favorecida

Cluster	Energia eletrostática favorecida		
	<i>Poses</i>	Representativo	<i>Weighted Score</i>
0	93	Centro	-752.8
		Menor energia	-779.9
1	74	-823.1	-823.1
		Menor energia	-875.9
2	70	Centro	-704.2
		Menor energia	-875.9

A tabela mostra o número de *poses* (o número de estruturas ancoradas), e o coeficiente de ponderação (*Weighted Score*) de acordo com a energia do centro do grupo (ou seja, a estrutura que possui o maior número de estruturas vizinhas no grupo) e o de menor energia.

A energia de afinidade da ligação é maior para a energia hidrofóbica, com coeficiente ponderado de menor energia de -1132.2 (Tabela 12), em comparação a energia eletrostática e de *Van der Waals* + eletrostática (Tabela 11 e Tabela 13).

Tabela 12 – Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-6VMS, de acordo com pontuações ponderadas no modelo de energia hidrofóbica favorecida

Cluster	Energia hidrofóbica favorecida		
	<i>Poses</i>	Representativo	<i>Weighted Score</i>
0	213	Centro	-794.8
		Menor energia	-1132.2
1	196	Centro	-792.2
		Menor energia	-1056.6
2	109	Centro	-802.3
		Menor energia	-845.5

A tabela mostra o número de *poses* (o número de estruturas ancoradas), e o coeficiente de ponderação (*Weighted Score*) de acordo com a energia do centro do grupo (ou seja, a estrutura que possui o maior número de estruturas vizinhas no grupo) e o de menor energia.

Tabela 13 – Três primeiros clusters gerados da interação 4XZP-6VMS, de acordo com pontuações ponderadas no modelo *Van der Waals* + eletrostática

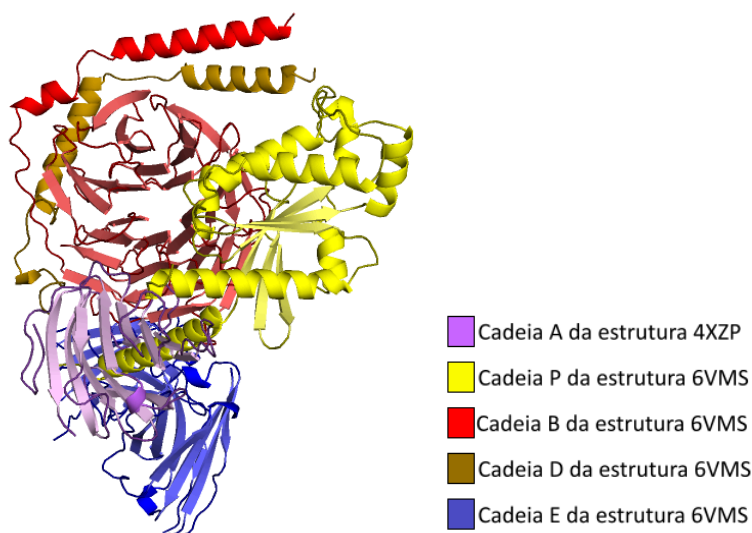
Cluster	<i>Van der Waals</i> + eletrostática		
	<i>Poses</i>	Representativo	<i>Weighted Score</i>
0	117	Centro	-208.0
		Menor energia	-256.5
1	82	Centro	-206.8
		Menor energia	-256.0

2	66	Centro	-227.0
		Menor energia	-244.8

A tabela mostra o número de *poses* (o número de estruturas ancoradas), e o coeficiente de ponderação (*Weighted Score*) de acordo com a energia do centro do grupo (ou seja, a estrutura que possui o maior número de estruturas vizinhas no grupo) e o de menor energia.

Em seguida, submeteu-se o modelo de docking molecular 4XZP-6VMS ao PDBsum. Na Figura 17 é possível visualizar em 3D do modelo de encaixe de energia mais favorável entre as estruturas 4XZP e 6VMS.

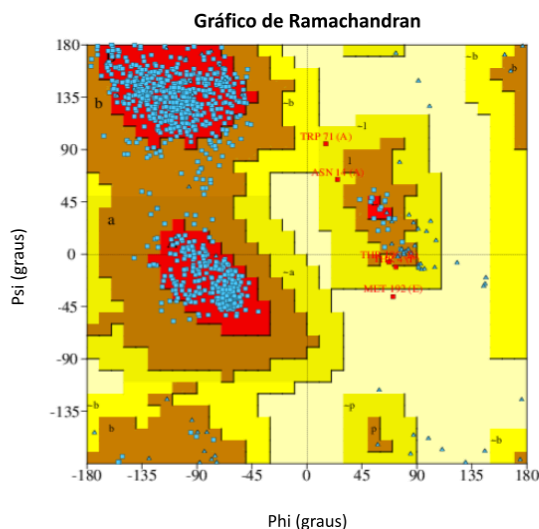
Figura 17 – Visualização esquemática da estrutura em 3D da interação mais favorável entre a estrutura 4XZP e a subunidade 6VMS gerado pelo PDBsum, no modelo de energia balanceada



Na legenda, a cadeia "P" é a cadeia A da estrutura 6VMS. Fonte: A autora com PyMOL.

Na Figura 18, é possível observar os dados visuais gerados pelo gráfico de Ramachandran, a partir da interação 4XZP-4TLL. Na análise estatística, 776 resíduos de um total de 883 resíduos não-glicina e não-prolina, foram definidos como regiões mais favoráveis (em vermelho no gráfico), o que representou um índice de 87.9% (VR: > 90%) (Tabela 14). Isso sugere adequada conformação dos ângulos ϕ e ψ na interação 4XZP-6VMS.

Figura 18 – Gráfico Ramachandran da interação entre as estruturas 4XZP e 6VMS



Cada ponto em azul ou vermelho indica um resíduo de aminoácido. Os espaços em vermelho indicam as regiões mais favoráveis a nível de energia de afinidade. Os espaços nas cores marrom e amarelo indicam regiões de interação menos favoráveis. Os espaços nas cores bege e branco indicam regiões não permitidas para ligações. Fonte: A autora com PDBsum.

Tabela 14 – Dados estatísticos do gráfico de Ramachandran através do PROCHECK

Classificação de regiões	Nº de resíduos	Porcentagem (%)
Mais favorecidas [A, B, L]	776	87.9%
Adicionalmente permitidas [a, b, l, p]	102	11.6%
Generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	4	0.5%
Não permitidas [XX]	1	0.1%
Resíduos não-Glicina e não-Prolina	883	100.0%
Resíduos terminais (com exclusão de Glicina e Prolina)	11	-
Resíduos de Glicina	78	-
Resíduos de Prolina	33	-
Número total de resíduos	1005	-

Com base na análise de 118 estruturas com resolução de pelo menos 2,0 Å e fator R não superior a 20,0, espera-se que um modelo de boa qualidade tenha mais de 90% nas regiões mais favorecidas [A,B,L]. Legenda: [A], indica região em que localizam-se as hélices- α ; [B], região em que localizam-se as folhas- β ; [L], indica região em que localizam-se as hélices levóginas; [a], indica região ao redor da hélice α , mas um pouco mais distante dos valores ideais; [b], indica região menos favorecida ao redor das folhas- β ; [l], indica região menos favorecida ao redor das hélices levóginas; [p], indica pequena região permitida associada a algumas conformações irregulares ou loops; [~], indica conformações não estereoquimicamente ideais; [XX], indica áreas de incompatibilidade geométrica; -, valor não fornecido.

Já em relação aos fatores G, que informam a medida de não-usualidade da interação analisada, foi visto um índice de -0.06 (VR: $S < -0.5$, incomum; $S < -1.0$, extremamente incomum) (Tabela 15), o que sugere que as estrutura analisadas não apresentam características geométricas incomuns.

Tabela 15 – Fatores-G do gráfico de Ramachandram através do PROCHECK

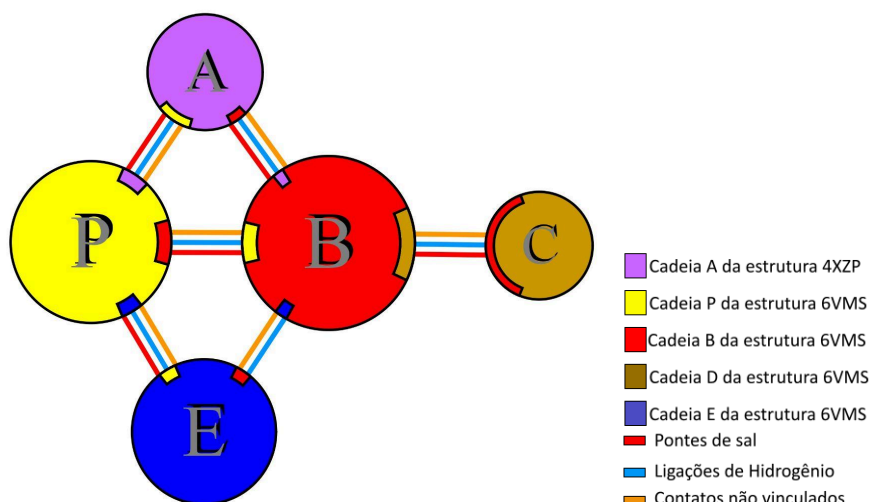
Parâmetro		Score (S)	Média do Score	Média geral
Ângulo diedro	Distribuição Phi-Psi	0,38	-0,06	0,04
	Distribuição Chi1-chi2	-0,35		
	Somente Chi1	-0,33		
	Chi3 e Chi4	0,49		
	Ômega	0,44		
Forças covalentes da cadeia principal	Comprimentos de ligação da cadeia principal	0,64	0,12	
	Ângulos de ligação da cadeia principal	-0,25		

Os fatores G indicam o nível de uma propriedade físico-química ser incomum, ou fora do comum. Classificação: $S < -0,5^*$ é incomum; $S < -1,0^{**}$ é altamente incomum. Observação importante: Os comprimentos de ligação da cadeia principal e os ângulos de ligação são comparados com os valores ideais de Engh & Huber (1991) derivados de dados de moléculas pequenas. Portanto, estruturas

refinadas usando diferentes restrições podem apresentar desvios aparentemente grandes da normalidade. Fonte: autora com PDBsum.

É possível observar que a cadeia A da estrutura 4XZP interage com as cadeias P e B da estrutura 6VMS (Figura 19).

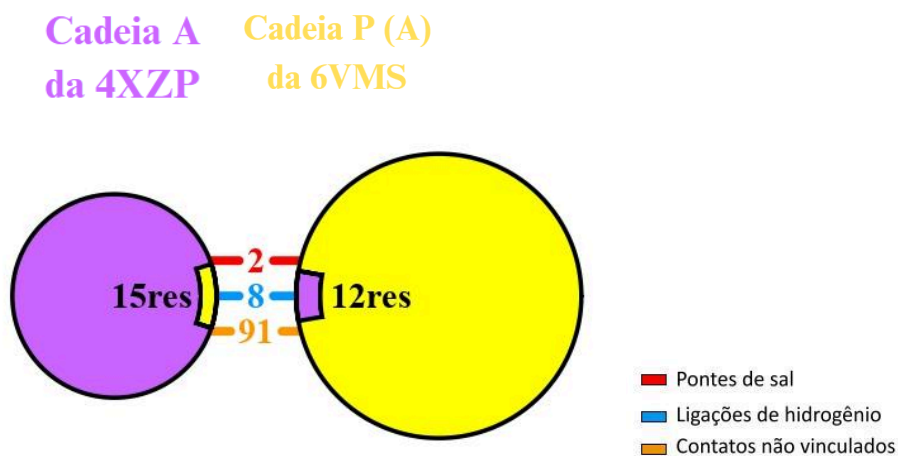
Figura 19 – Esquema visual dos tipos de cadeias e de ligações na interação entre a subunidade 4XZP da Gal-4 e a estrutura 6VMS do receptor dopaminérgico D2



Na legenda, a cadeia “P” é a cadeia A da estrutura 6VMS. É possível observar que a cadeia A da subunidade 4XZP, interage com as cadeias A e B da estrutura 6VMS, e não interage com as cadeias E e C. Fonte: autora com PDBsum.

Observa-se que a interação entre a cadeia da estrutura 4XZP e cadeia P(A) da estrutura 6VMS, pode ocorrer através de 2 pontes de sal e 8 ligações de Hidrogênio (Figura 23). A análise estatística da interface da interação entre as cadeias A e P (A) pode ser vista na Tabela 16.

Figura 20 – Diagrama esquemático visual de interações entre a estrutura 4XZP e a cadeia P da estrutura 6VMS



Interface proteína-proteína da cadeia A da estrutura 4XZP e cadeia P (cadeia A) da estrutura 6VMS. É possível observar que 15 resíduos na cadeia A interagem com 12 resíduos da cadeia D. A interação entre a cadeia A e a cadeia P se dá a partir de 2 pontes de sal e 8 ligações de hidrogênio. Há 91 contatos não vinculados. A área de cada círculo é proporcional a superfície da área que corresponde à cadeia proteica. Fonte: autora com PDBsum.

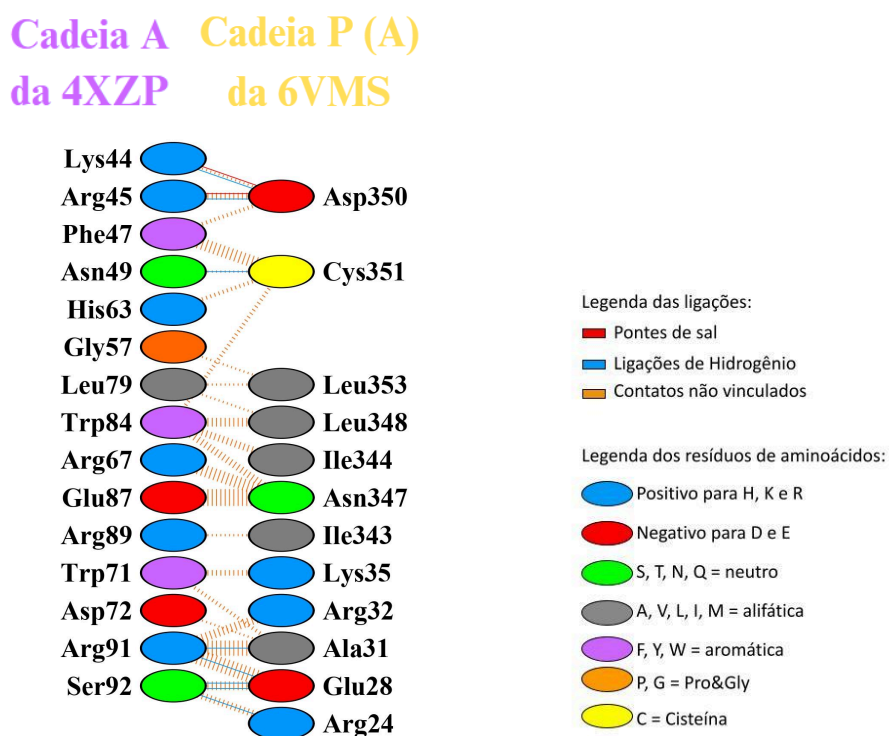
Tabela 16 – Análise estatística da predição das cadeias A e P (A)

Estrutura	Cadeia proteica	Nº de resíduos na interface	Área da interface (Å²)	Nº de pontes de sal	Nº de pontes dissulfeto	Nº de pontes de hidrogênio	Nº de contatos não-vinculados
4XZP	A	15	679	2	-	8	91
6VMS	P (A)	12	734				

Legenda: -, ausência de ligação. Fonte: autora com PDBsum.

Na Figura 21 e Tabela 17 estão descritas as interações entre resíduos de aminoácidos da cadeia A da estrutura 4XZP e da cadeia D da subunidade 4TLL.

Figura 21 – Esquema visual das interações entre os resíduos aminoácidos das cadeias A e P(A)



Legenda: H, Histidina; K, Lisina; R, Arginina; D, Ácido Aspártico; E, Ácido Glutâmico; S, Serina; T, Treonina; N, Asparagina; Q, Glutamina; A, Alanina; V, Valina; L, Leucina; I, Isoleucina; M, Metionina; F, Fenilalanina; Y, tirosina; W, Triptofano; P, Prolina; G, Glicina. Fonte: autora com PDBsum.

Tabela 17 – Interações entre aminoácidos da cadeia A da estrutura e P(A) e principais propriedades físico-químicas

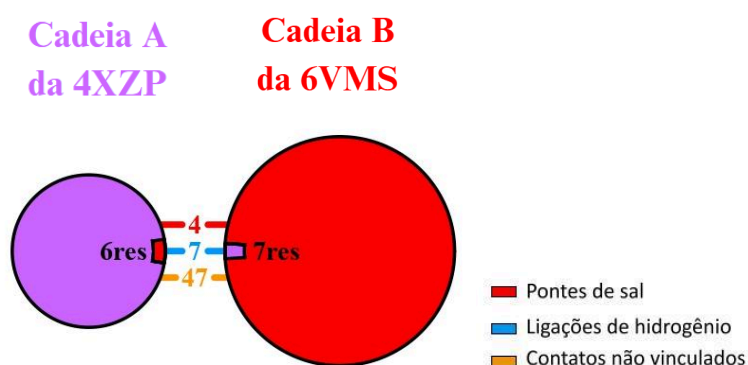
Aminoácidos da cadeia A da estrutura 4XZP	Propriedade físico-química	Aminoácidos da cadeia P(A) da estrutura 6VMS	Propriedade físico-química	Tipo de ligação química da interação
Lys44	Carga elétrica positiva	Asp350	Carga elétrica negativa	Ponte de sal e Ligação de Hidrogênio
Arg45	Carga elétrica positiva	Asp350	Carga elétrica negativa	Ponte de sal e Ligação de Hidrogênio
Asn49	Aminoácidos polares, mas	Cys351	Aminoácido polar	Ligação de Hidrogênio

	não carregados			
Arg91	Pro&Gly	Ala31	Cadeia alifática	Ligação de Hidrogênio
Arg91	Pro&Gly	Glu28	Carga elétrica negativa	Ligação de Hidrogênio
Ser92	Aminoácidos polares, mas não carregados	Glu28	Carga elétrica negativa	Ligação de Hidrogênio
Ser92	Aminoácidos polares, mas não carregados	Arg24	Carga elétrica positiva	Ligação de Hidrogênio

Fonte: autora com PDBsum.

Já em relação a interação predita entre a cadeia da estrutura 4XZP e cadeia B da estrutura 6VMS, pode ocorrer através de 4 pontes de sal e 7 ligações de Hidrogênio (Figura 17). A análise estatística da interface da interação entre as cadeias A e B pode ser vista na Tabela 18.

Figura 22 – Diagrama esquemático visual de interações entre a estrutura 4XZP e a cadeia B da estrutura 6VMS



Interface proteína-proteína da cadeia A da estrutura 4XZP e da cadeia B da estrutura 6VMS. É possível observar que 6 resíduos na cadeia A interagem com 7 resíduos da cadeia D. A interação entre a cadeia A e a cadeia B se dá a partir de 4 pontes de sal e 8 ligações de hidrogênio. Há 91 contatos não vinculados. A área de cada círculo é proporcional a superfície da área que corresponde à cadeia proteica. Fonte: autora com PDBsum.

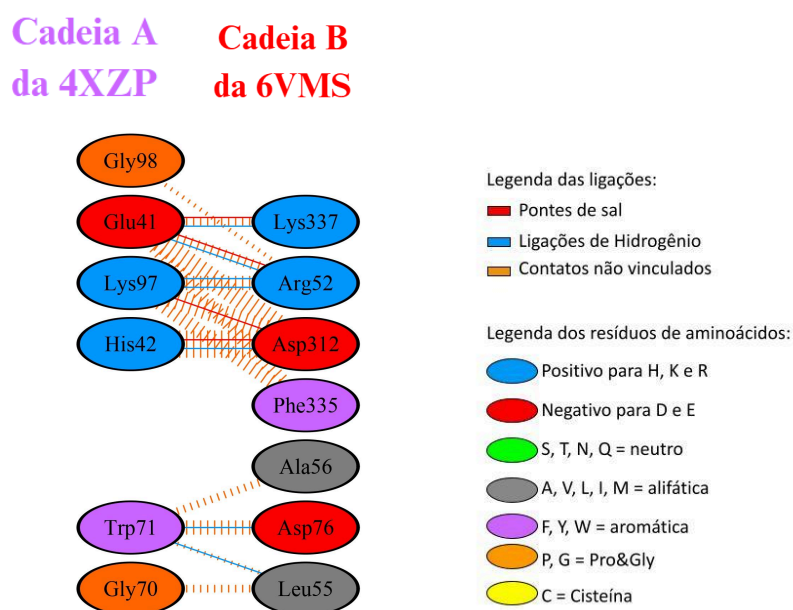
Na Tabela 18 e Figura 23 estão descritas as interações entre resíduos de aminoácidos da cadeia A da estrutura 4XZP e da cadeia B da estrutura 6VMS.

Tabela 18 – Análise estatística da predição das cadeias A e B

Estrutura	Cadeia proteica	Nº de resíduos na interface	Área da interface (Å²)	Nº de pontes de sal	Nº de pontes dissulfeto	Nº de pontes de hidrogênio	Nº de contatos não-vinculados
4XZP	A	6	331	4	-	7	47
6VMS	B	7	324				

Legenda: -, ausência de ligação. Fonte: autora com PDBsum.

Figura 23 – Esquema visual das interações entre os resíduos aminoácidos das cadeias A e B



Legenda: H, Histidina; K, Lisina; R, Arginina; D, Ácido Aspártico; E, Ácido Glutâmico; S, Serina; T, Treonina; N, Asparagina; Q, Glutamina; A, Alanina; V, Valina; L, Leucina; I, Isoleucina; M, Metionina; F, Fenilalanina; Y, tirosina; W, Triptofano; P, Prolina; G, Glicina. Fonte: autora com PDBsum.

Os resultados do modelo de predição de interação, sugerem afinidade da Gal-4 pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e receptores dopaminérgicos D2. Isso foi demonstrado a partir da predição de interação de energia de afinidade mais favorável em meio balanceado entre as proteínas 4XZP-4TLL e 4XZP-6VMS, e alta confiabilidade estereoquímica do modelo quanto a geometria da estrutura geral e local. No meio balanceado, a interação das estruturas 4XZP-4TLL apresentou energia de ligação mais favorável quando em comparação a interação das

estruturas 4XZP-6VMS. Já no meio hidrofóbico, a interação das estruturas 4XZP-6VMS apresentou energia de ligação mais favorável quando em comparação a interação das estruturas 4XZP-4TLL.

Quanto a caracterização físico-química das ligações, a interação de energia mais favorável da estrutura da cadeia A da estrutura 4XZP da Gal-4 pela cadeia D da estrutura 4TLL do receptor glutamatérgico do tipo NMDA, se dá a partir pontes de hidrogênio e de sal. Já a cadeia A da estrutura 4XZP interage com as cadeias A e B da estrutura 6VMS de receptor dopaminérgico D2.

5.2 Influência de Gal-4 em vias de sinalização relacionadas à homeostase, plasticidade sináptica e neuromodulação

Para investigar a influência da Gal-4 endógena na homeostasia, plasticidade sináptica e neuromodulação, realizou-se uma análise por imunocitoquímica em que a cultura de neuroblastoma humana foi submetida de forma independente às condições de excitação e inibição da atividade neuronal, e antagonismo de receptores glutamatérgicos e dopaminérgicos. Na Figura 24, é demonstrado a quantificação da expressão endógena de Gal-4 em culturas de neuroblastoma humano submetidas a diferentes condições farmacológicas: a) inibição sináptica por Muscimol (10 μ M); b) estimulação sináptica por Picrotoxina (100 μ M); c) bloqueio de receptores NMDA por APV (30 μ M); d) antagonismo de receptores dopaminérgicos D2 por Eticloprida (1 μ M). A imunorreatividade celular (Média) foi avaliada por imunocitoquímica através de marcação da Gal-4 pelo anticorpo anti-Galectina-4.

Foi visto um aumento significativo na expressão endógena da Gal-4 durante o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA com APV (10 μ M) (Média = 123.451; Z= 7.047; Z= 5.210; Z= 4.215; $p < 0,0001$), e com o bloqueio de vias dopaminérgicas através do receptor D2 com Eticloprida (Média = 122.302; Z= 8.130; $p < 0,0001$; Z= 6.191; $p < 0,0001$; Z= 7.246; $p < 0,0001$) em comparação aos grupos Controle (Média = 99.954), Muscimol (Média = 105.29) e Picrotoxina (Média = 107.086), respectivamente.

Além disso, é possível visualizar que a Gal-4 é expressa no núcleo nas condições de excitação, inibição e regulação de vias dopaminérgicas e glutamatérgicas, em neurônios de linhagem SH-SY5Y.

As células foram tratadas com Muscimol (10 μ M), Picrotoxina (100 μ M), APV (30 μ M) ou Eticloprida (1 μ M), e a imunorreatividade de Gal-4 foi avaliada por imunocitoquímica utilizando anticorpo anti-Gal-4. (A) mostram imagens representativas analisadas por microscópios de fluorescência de neurônios SH-SY5Y submetidos à técnica imunocitoquímica com anticorpos anti-Galectina-4 e anti- β -Actina. ROIs nucleares neuronais foram identificados por DAPI. (B) Os níveis de IR de Gal-4 foram quantificados como projeção de intensidade média de duas a três seções ópticas usando o software ImageJ. A barra de escala é de 300 μ m. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de dois experimentos independentes. Foi realizado o teste ANOVA de uma via seguido de análise de comparações múltiplas do teste de Kruskal-Wallis, sendo **** $p < 0.001$. Grupo CT, refere-se ao grupo controle em que não houve tratamento com drogas farmacológicas. Grupo MUS, refere-se ao grupo em que foi administrado o Muscimol; Grupo PTX refere-se ao grupo em que foi administrado a Picrotoxina; Grupo APV, refere-se ao grupo em que foi administrado APV; Grupo ETI, refere-se ao grupo em que foi administrado Eticloprida.

5.3 Níveis endógenos de Gal-4 influenciam a expressão do fator de transcrição pCREB em cultura de neuroblastoma humano

Após a confirmação de que a expressão endógena de Gal-4 é modulada por atividade neuronal, avaliamos se a Gal-4 influencia a expressão do fator de transcrição fosfo-CREB (pCREB), marcador central de processos de plasticidade sináptica, memória e aprendizado. Para isso, culturas de neuroblastoma humano foram incubadas com anticorpo anti-Gal-4 para bloqueio da proteína endógena, seguidas da detecção de pCREB por imunocitoquímica.

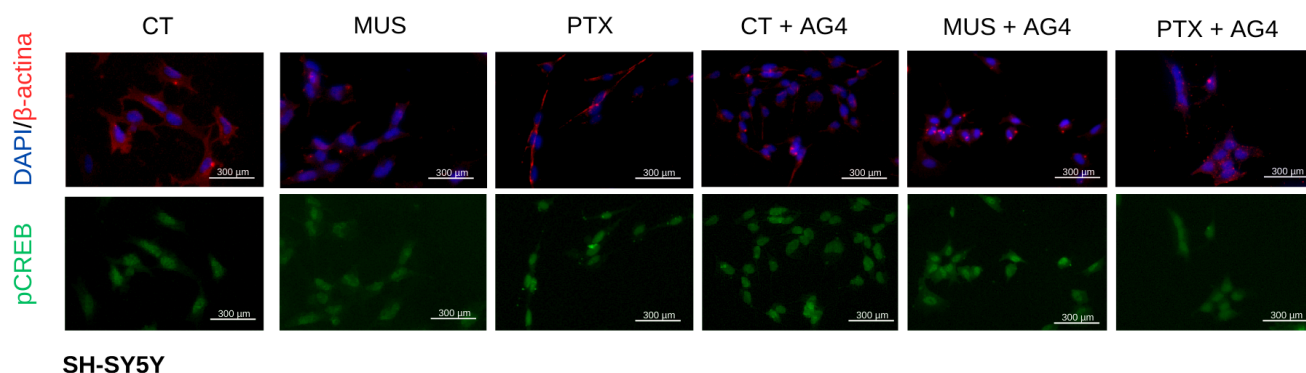
A Figura 25 mostra que o tratamento com Picrotoxina (100 μ M) promoveu um aumento significativo nos níveis de pCREB com IR de 121.52, em relação ao grupo controle (Média = 99.973; $Z = 6.524$; $p < 0,01$) e ao grupo Muscimol (Média = 98.526; $Z = 0.8363$; $p < 0,05$), corroborando o papel da excitação neuronal após ativação desse fator de transcrição.

O bloqueio de Gal-4 alterou significativamente o perfil de expressão de pCREB. Isso foi visto a partir da menor expressão endógena de pCREB nos grupos estimulado com Picrotoxina (Média = 103.92), bloqueado com Muscimol (Média = 97.81) e Controle (Média = 100.01), todos com bloqueio de Gal-4 endógena, em comparação ao grupo estimulado com Picrotoxina e sem bloqueio da Gal-4 (Média = 121.52; $Z = 5.455$; $Z = 6.775$; $Z = 5.679$; $p < 0,0001$). Isso indica que a presença funcional de Gal-4 potencializa a ativação de pCREB em condições de excitação.

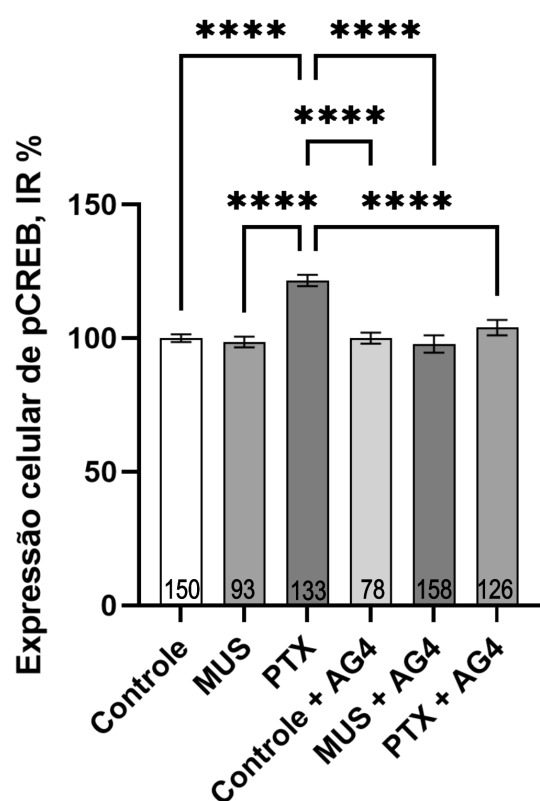
Esses dados sugerem que Gal-4 exerce um papel modulador positivo na regulação da via pCREB.

Figura 25 – A expressão de pCREB é influenciada por alterações nos níveis endógenos de Gal-4 em cultura de neuroblastoma humano

A



B



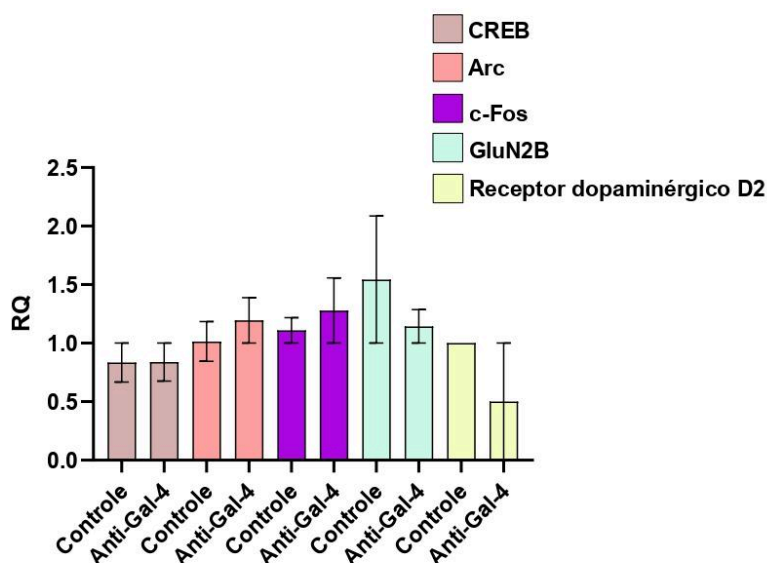
(A) São mostradas imagens de microscopia fluorescente representativas de neurônios SH-SY5Y submetidos à imunocitoquímica quantitativa com anticorpos anti-pCREB e anti-β-Actina. ROIs nucleares neuronais foram identificados por DAPI combinado com colorações de β-Actina. (B) São

demonstrados os níveis de IR de pCREB foram quantificados como projeção de intensidade média de duas a três seções ópticas usando o software ImageJ. A barra de escala é de 300 μ m. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Foi realizado o teste ANOVA de uma via e seguido de análise de comparações múltiplas do teste de Kruskal-Wallis, sendo **** $p < 0.001$. Grupo CT, refere-se ao grupos controle em que não foi realizado tratamento com droga farmacológica; Grupo MUS, refere-se ao grupo em que foi administrado o Muscimol; Grupo PTX, refere-se ao grupo em que foi administrada a Picrotoxina; Grupo Controle + AG4, refere-se ao grupo em que houve bloqueio endógeno da Gal-4 após administração do anticorpo Anti-Gal-4; Grupo MUS + AG4, refere-se ao grupo em que foi administrado o Muscimol e o anticorpo Anti-Gal-4; Grupo PTX, refere-se ao grupo em que foi administrado a Picrotoxina e o anticorpo Anti-Gal-4.

5.4 O bloqueio da Gal-4 endógeno não altera a expressão de genes como CREB, ARC, CFOS, receptores glutamatérgicos GLUN2B e receptor dopaminérgico D2

Considerando que a Gal-4 parece responder à modulação da atividade sináptica, investigamos se sua presença também influencia a expressão gênica de marcadores clássicos da plasticidade sináptica. A expressão dos genes pCREB, GLUN2B (subunidade NR2B do receptor NMDA), ARC, c-Fos e receptor D2 de dopamina foi avaliada. No entanto, a análise estatística (ANOVA de uma via) não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais, sugerindo que o bloqueio da Gal-4 não impactou diretamente a transcrição desses genes, independentemente da condição sináptica induzida.

Figura 26 – Expressão relativa do CREB, ARC, CFOS, subunidade GluN2B de receptor glutamatérgico do tipo NMDA e receptor dopaminérgico D2



A quantificação relativa (RQ) dos dados da qPCR foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A expressão dos genes CREB, Arc, c-Fos, GluN2B e receptor dopaminérgico D2, foi quantificada por qPCR e normalizada em relação ao gene de referência β -Actina. Comparação da expressão de níveis endógenos de CREB, Arc, c-Fos, subunidade GluN2B do receptor glutamatérgico do tipo NMDA e receptor dopaminérgico D2, em neurônios com e sem bloqueio endógeno da Galectina-4. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) de dois experimentos independentes, sendo $p < 0,05$. Foi realizado o teste ANOVA de uma via e teste Brown-Forsythe. Grupo Controle refere-se ao grupo em que não houve bloqueio endógeno da Galectina-4. Grupo Anti-Gal-4, refere-se ao grupo em que houve bloqueio endógeno da Galectina-4.

5.5 O bloqueio endógeno da Gal-4 intra-hipocampal não altera a resposta de medo dos animais, não causa fenótipos comportamentais associados a sintomas de ansiedade e não altera a função locomotora

Para analisar o efeito de Gal-4 na consolidação de memórias aversivas dependente de hipocampo, os animais receberam a infusão de anticorpo anti-Gal-4 diretamente no hipocampo, imediatamente após o treinamento na tarefa de medo condicionado contextual. Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos ao teste de retenção, no qual o tempo de imobilidade (*freezing*) foi registrado como medida da consolidação da memória aversiva.

Como mostrado na Figura 27A, o bloqueio intra-hipocampal da Gal-4 não alterou significativamente a resposta de imobilidade dos animais, indicando que,

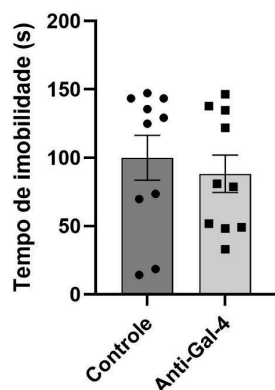
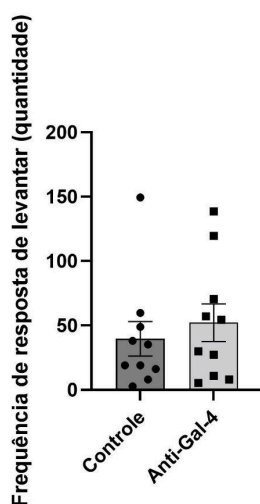
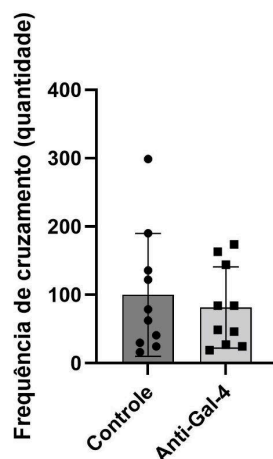
nesta tarefa específica e nesta região cerebral, a Gal-4 não parece ser essencial para a consolidação da memória de medo.

Em seguida, avaliamos se o bloqueio da Gal-4 no hipocampo induziria alterações nos comportamentos locomotor (Figura 27C) e exploratório (Figura 27B), por meio do teste do campo aberto. Os dados mostram que tanto a frequência de levantamento (Figura 27A) quanto a atividade locomotora avaliada pelos cruzamentos entre quadrantes (Figura 27B) não foram afetadas pela inibição da galectina.

A Figura 28 apresenta os resultados do teste do labirinto em cruz elevada, amplamente utilizado para a avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade. O bloqueio da Gal-4 no hipocampo não alterou o tempo de permanência nos braços abertos (Figura 28A) ou fechados (Figura 28C), tampouco o número de entradas nesses braços (Figuras 28B e 28D, respectivamente).

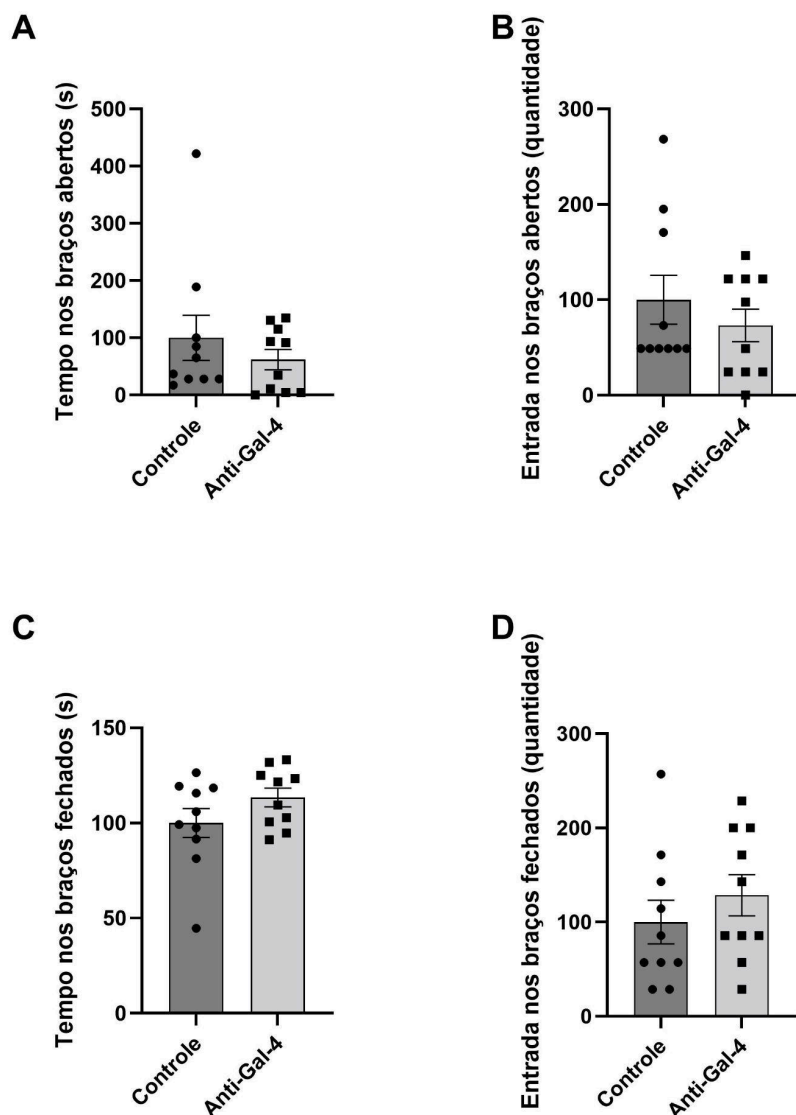
Os resultados sugerem que Gal-4 intra-hipocampal parece não afetar a consolidação de memória aversiva e o comportamento de animais.

Figura 27 – Teste de Medo Condicionado Contextual e Teste de Campo Aberto

A**B****C**

Efeito comportamental do bloqueio endógeno da Galectina-4 imediatamente após o treino de Teste de Medo Condicionado Contextual. Cada animal recebeu infusões bilaterais de 0,5 µl de PBS para o Grupo Controle e 0,5µg/µL de anticorpo anti-Galectina-4 para o Grupo Anti-Gal-4, imediatamente após o primeiro dia de treinamento do medo. (A) Tempo de imobilidade (em segundos) no TMCC, comparando os grupos controle e tratado com anti-Gal-4. (B) Frequência de comportamentos de levantamento (*rearing*) registrados no TCA. (C) Frequência de cruzamentos entre quadrantes no TCA, indicando atividade locomotora geral. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes. Foi aplicado teste de Mann-Whitney, * $p < 0.05$. O grupo Controle teve um $n=10$ e o Grupo Anti-Gal-4 teve um $n=10$.

Figura 28 – Teste do Labirinto em Cruz Elevado



Efeito comportamental do bloqueio endógeno da Galectina-4 através do Teste de Labirinto em Cruz Elevado, realizado imediatamente após o treino de Teste de Medo Condicionado Contextual e Teste de Campo Aberto. (A) Tempo nos braços abertos (em segundos) no TLCE, comparando os grupos controle e tratado com anti-Gal-4. (B) Quantidade de entradas nos braços abertos registrados no TLCE. (C) Tempo nos braços abertos (em segundos) no TLCE, comparando os grupos controle e tratado com anti-Gal-4. (D) Quantidade de entradas nos braços fechados registrados no TLCE. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes. Foi aplicado teste de Mann-Whitney, * $p < 0.05$. O grupo Controle teve um $n=10$ e o Grupo Anti-Gal-4 teve um $n=10$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem, pela primeira vez na literatura, que a Gal-4 pode modular vias de sinalização fundamentais na plasticidade sináptica, memória e aprendizado.

Os resultados *in silico* sugerem interação estável entre a cadeia A da estrutura 4XZP da Gal-4, a cadeia D da estrutura 4TLL do RNMDA, e as cadeias A e B da estrutura 6VMS do RDD. Nessas interações, há predominância de ligações de hidrogênio e pontes de sal no sítio de ligação. A análise estereoquímica do docking molecular pelo PDBsum, das estruturas 4XZP-4TLL e 4XZP-6VMS, apresentou conformações entre os ângulos ϕ e ψ moderadamente abaixo do valor de referência (4XZP-4TLL: 89.1% e 4XZP-6VMS: 87.9%, VR: > 90%). No entanto, é comum encontrar em estudos *in silico* com estruturas modeladas, valores levemente abaixo de 90% que representam uma alta similaridade com a estrutura nativa (Anand, Mukherjee e Padmanabhan, 2024).

Além disso, a análise do fator G refletiu ausência de significativas distorções na geometria das estruturas analisadas em ambos modelos de interação (4XZP-4TLL: -0.19 e 4XZP-6VMS: -0.06, VR: VR: S < -0.5, incomum; S < -1.0, extremamente incomum), o que reforça a qualidade e confiabilidade do modelo estrutural utilizado na análise da predição de interação molecular. A predominância de ligações de hidrogênio nas interações 4XZP-4TLL e 4XZP-6VMS, indica aumento da estabilidade de interações entre os CRDs (Rustiguel et al., 2016).

Estudos mostram que as galectinas podem interagir com uma variedade de receptores de superfície celular, e a Gal-4 pode mediar a transcitose apical de alguns como o receptor de transferrina em células epiteliais (Bay et al., 2014; Troncoso et al., 2023). Esses dados contribuem para sustentar a hipótese de predição de interação entre Gal-4 e receptores glutamatérgicos e dopaminérgicos.

Quanto aos métodos *in silico* utilizados, embora o uso das ferramentas ClusPro e PDBsum permitiram, respectivamente, a predição da energia de afinidade de ligação mais favorável da interação das estruturas 4XZP-4TLL e 4XZP-6VMS e a validação do modelo utilizado, há limitações inerentes à natureza preditiva e estática dessas abordagens computacionais. A ausência de modelagem flexível e validação cruzada com outros algoritmos computacionais e análises dinâmicas, ressalta a

necessidade de estudos complementares e comparativos para validar os resultados observados (Desta et al., 2020).

Além disso, o ClusPro apresenta valores de predição de energia baseados no tamanho do cluster e não da energia, uma vez que o algoritmo PIPER não está diretamente relacionado à afinidade de ligação (Kozakov et al., 2017). No entanto, regiões de baixa energia tendem a gerar grandes clusters de estruturas ancoradas, e o tamanho de um cluster é aproximadamente proporcional à sua probabilidade, ou seja, ao seu nível de proximidade à estrutura nativa (Kozakov et al., 2017). Portanto, ainda assim o cenário energético descrito pelo ClusPro determina indiretamente a conformação mais provável do complexo (Kozakov et al., 2017).

A indução de atividade sináptica por picrotoxina é um modelo clássico em neurociência experimental para promover desinibição neuronal via bloqueio dos receptores GABA_A (Otmakhov et al., 2004). Esse paradigma permite avaliar como a intensificação da excitabilidade neuronal afeta a expressão de moléculas envolvidas na plasticidade sináptica e na regulação homeostática dos circuitos neurais (Chipman et al., 2022). Em contrapartida, o uso de agonistas GABAérgicos, como o muscimol, reduz a atividade de disparo neuronal, funcionando como modelo oposto de supressão da excitabilidade (Marty et al., 1996).

A partir dos protocolos aplicados para estimulação e inibição da atividade sináptica, nossos resultados indicaram que a expressão endógena da Gal-4, avaliada por ICC, não foi alterada sob essas condições. No entanto, observou-se um aumento significativo na expressão de Gal-4 após o bloqueio farmacológico das vias glutamatérgica e dopaminérgica, mediadas pelos receptores NMDA e dopaminérgicos D2, respectivamente. Esses achados sugerem que a Gal-4 pode atuar como um elemento compensatório ou adaptativo frente à redução da excitabilidade sináptica, participando de mecanismos moleculares envolvidos na modulação da plasticidade sináptica, nos processos de memória e aprendizado, bem como no processamento de informações emocionais. Tais vias, quando inibidas, podem desencadear respostas adaptativas de reorganização proteica, das quais a Gal-4 parece fazer parte (Parsons, Stöffler e Danysz, 2007; Lijffijt et al., 2019).

O antagonismo de receptores NMDA tem sido associado à redução da hiperativação neurotóxica do glutamato, promovendo a restauração da homeostase glutamatérgica. Logo, a hiperativação crônica, leve e contínua destes receptores pode comprometer a plasticidade sináptica e causar danos neurais (Parsons, Stöffler

e Danysz, 2007; McCormick et al., 2013; Lijffijt et al., 2019). O antagonismo de receptores NMDA exerce efeitos neuroprotetores e contribui para a reversão de déficits de memória e aprendizado, especialmente no contexto da Doença de Alzheimer (Parsons, Stöffler e Danysz, 2007). Além disso, evidências indicam que o bloqueio de receptores dopaminérgicos do tipo D2 pode proteger contra a neurotoxicidade induzida pela agregação da proteína Tau (McCormick et al., 2013). Esses achados sustentam a hipótese de que a Gal-4 pode exercer um papel neuroprotetor modulando, direta ou indiretamente, as vias glutamatérgica e dopaminérgica. Isso pode ser futuramente avaliado em modelos de estudo de neurotoxicidade com *C. elegans* e cultura neuronal primária.

No presente estudo, foi observada expressão nuclear de Gal-4 na linhagem celular SH-SY5Y, achado que contrasta com a localização mais citoplasmática da galectina em linhagens de câncer pancreático (Belo et al., 2013). A presença de uma proteína no núcleo pode indicar interação com fatores de transcrição, participando de processos como ativação ou repressão gênica, modulação epigenética, ou regulação pós-transcricional. A glicoproteína pode ser localizada no núcleo como forma de regulação dinâmica, sendo ativada ou translocada em resposta a estímulos específicos (SZAFLARSKI et al., 2013; Henao et al., 2022).

O bloqueio da Gal-4 endógena resultou em uma redução dos níveis de CREB fosforilado (pCREB - forma ativa), especialmente nas condições em que a ativação desse fator de transcrição havia sido previamente induzida por desinibição neuronal com picrotoxina (Figura 25). Esse achado sugere que, embora a Gal-4 não responda de forma clássica à atividade sináptica, ela pode atuar em mecanismos celulares que modulam a transdução de sinais subsequentes à ativação sináptica. Este efeito pode indicar um papel permissivo ou facilitador de Gal-4 na cascata intracelular que leva à ativação do pCREB — molécula-chave na regulação da plasticidade sináptica, consolidação da memória e reorganização de circuitos neurais (Barco & Marie, 2011; Benito & Barco, 2010). A fosforilação de CREB em Ser133 depende da ativação de quinases como PKA, CaMKIV e MAPK/ERK, as quais são estimuladas por influxo de cálcio e pela sinalização de segundos mensageiros gerados após a despolarização neuronal (Shaywitz & Greenberg, 1999). Essa ativação ocorre frequentemente sob influência de neuromoduladores como glutamato e dopamina, via receptores NMDA e D2, respectivamente (Schurov et al., 1999; Kashihara et al., 1999). A diminuição de pCREB observada nas culturas de neuroblastoma humano com bloqueio da

Gal-4 sugere que esta glicoproteína possa estar envolvida na manutenção da estabilidade da sinalização a montante de CREB — potencialmente influenciando a organização de receptores e canais iônicos, à atividade de enzimas reguladoras, a integridade de microdomínios lipídicos ou a liberação de mediadores tróficos (Bailey, Barreca & O'Hare, 2007; Lonze & Ginty, 2002; Liu et al., 2018; Finkbeiner et al., 1997). Este dado está de acordo com a expressão nuclear da galectina na cultura de neuroblastoma. Além disso, a galectina deve ser translocada para o núcleo para regulação de fatores de transcrição, o qual pode ser facilitada pela ligação de Gal-4 a receptores dopaminérgicos e glutamatérgicos, como sugerido pelos dados *in silico*.

Novos experimentos são necessários para aprofundar a compreensão da sinalização intracelular associada à Gal-4, especialmente em relação à sua localização nuclear e possível papel regulador. Uma abordagem promissora consiste em comparar os níveis de CREB total e fosforilado (pCREB) a fim de investigar se há uma correlação entre a atividade da Gal-4 e a modulação funcional de CREB. Além disso, será fundamental avaliar se essa lectina está envolvida em vias sinalizadoras a montante, como a CaMKII- α e a MAPK/ERK, as quais estão diretamente associadas à fosforilação de CREB e à indução de mecanismos de plasticidade sináptica.

Apesar da redução da expressão de pCREB após bloqueio proteico endógeno de Gal-4 no ICC, o bloqueio da Gal-4 endógena não induziu alterações nos níveis de mRNA de genes clássicos associados à plasticidade sináptica, como CREB e Arc, tampouco modulou a expressão de receptores dopaminérgicos D2 e da subunidade GluN2B de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Esse achado sugere que a Gal-4 não atua como reguladora transcrricional direta, mas pode influenciar mecanismos pós-transcripcionais, como a estabilidade proteica, o tráfego intracelular ou a fosforilação de proteínas já expressas (Lee et al., 2023; Bailey, Barreca e O'Hare, 2007; Jacob e Gorek, 2024; Yoshii et al. 2002).

O fato de que o bloqueio de receptores D2 e NMDA tenha levado ao aumento da expressão proteica de Gal-4, mas que o bloqueio de Gal-4 não tenha alterado a expressão gênica dos próprios receptores, reforça a ideia de que Gal-4 é um alvo *downstream* de vias glutamatérgicas e dopaminérgicas, participando de respostas adaptativas a alterações sinápticas, mas não regulando diretamente a expressão desses receptores.

É importante destacar que a análise da expressão gênica avaliou os níveis de CREB total por qPCR, enquanto os níveis proteicos foram investigados a partir da forma ativada do fator de transcrição pCREB. Essa distinção é relevante, pois o CREB exerce sua função transcricional apenas quando fosforilado, principalmente na serina 133. Portanto, os níveis de mRNA de pCREB não refletem necessariamente sua atividade funcional, e alterações nos níveis de pCREB podem ocorrer independentemente da transcrição do gene CREB (Gosselin, 2025). Dessa forma, o bloqueio da Gal-4 endógena não alterou a expressão do gene CREB, mas reduziu os níveis de sua forma proteica ativa, o que, mais uma vez sugere, que Gal-4 pode estar envolvida na modulação de vias de sinalização que levam à fosforilação do CREB (Kandel, 2012). Esses resultados reforçam a hipótese de que a Gal-4 atua em nível pós-transcricional ou sinalizador, e não diretamente como reguladora da transcrição gênica.

Esse padrão de dissociação entre efeitos moleculares pós-transcricionais e estabilidade da expressão gênica também tem sido descrito para outras galectinas, como a Galectina-3, em modelos de neuroinflamação e plasticidade sináptica (Chen et al., 2022; Mijailović et al., 2023). A Galectina-3 também apresenta efeito anti-apoptótico via translocação nuclear (Takenaka et al., 2004; Jacob e Gorek, 2024).

A ausência de efeito comportamental observado sugere que a Gal-4 pode não desempenhar um papel crítico na consolidação da memória hipocampal associada ao medo contextual. No entanto, esse achado não exclui sua participação em outros aspectos da plasticidade sináptica e da memória em diferentes regiões do sistema nervoso central.

A plasticidade sináptica é um fenômeno altamente regional. Por exemplo, processos como habituação, aprendizagem associativa, motivação e regulação emocional envolvem circuitos extra-hipocampais, como o córtex pré-frontal, a amígdala e o estriado (Fonzo, 2018; Seidemann et al., 2021). Assim, é possível que a Gal-4 atue modulando a plasticidade e a memória em estruturas cerebrais distintas, ou sob paradigmas comportamentais diferentes, como aprendizado por reforço, memória emocional não contextual, ou tarefas que envolvem tomada de decisão e cognição social.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir, de forma inédita na literatura, que a Gal-4 endógena apresenta um potencial papel neuromodulador na plasticidade sináptica, mediado por mecanismos pós-transcricionais envolvendo as vias NMDA/pCREB e D2/pCREB. Além disso, seus efeitos parecem não estar relacionados a um papel de sensor direto da atividade neuronal — via excitação ou inibição sináptica —, mas sim ao controle modulatório de pCREB associado à sinalização glutamatérgica e dopaminérgica, responsáveis por modular a plasticidade sináptica, a memória e o aprendizado.

Abaixo segue as respostas de cada objetivo específico do presente trabalho:

- Identificou-se predição de afinidade de ligação de Gal-4 com receptores dopaminérgicos e glutamatérgicos *in silico*;
- A partir de análise pela técnica de imunocitoquímica, identificou-se que a expressão gênica e proteica endógena de Gal-4 não é influenciada por estimulação ou inibição sináptica, em cultura de neuroblastoma humano;
- A partir de análise pela técnica de imunocitoquímica, observou-se que o antagonismo de vias dopaminérgicas e glutamatérgicas afeta a expressão de Gal-4 endógena em cultura de neuroblastoma humano;
- A partir de análise pela técnica de imunocitoquímica, observou-se que o pCREB, principal fator de transcrição relacionado a plasticidade sináptica e aprendizado, é afetado pelo bloqueio endógeno de Gal-4;
- A análise por qPCR observou-se que o bloqueio endógeno de Gal-4 não afetou a expressão de genes importantes para o processo de plasticidade sináptica e aprendizado em cultura de neuroblastoma;
- A análise comportamental a partir do bloqueio de Gal-4 no hipocampo de roedores não alterou a consolidação da memória e sintomas de ansiedade pelo teste de medo condicionado contextual.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir desses achados, emergem questões-chave que podem orientar futuras investigações sobre o papel funcional da Gal-4 no cérebro:

a) A neuromodulação exercida pela Gal-4 endógena ocorre por meio de vias compensatórias adaptativas ou reflete processos desregulados com potencial neurotóxico e neuroinflamação?

b) Sua atuação na via pCREB envolve cascatas relacionadas às vias CamKII-alfa-MAPK/ERK?

c) A expressão funcional da Gal-4 pode contribuir para a manutenção da sinalização sináptica mediada por pCREB em contextos de distúrbios cognitivos e emocionais, por meio de mecanismos como o tráfego e a organização de receptores que induzem sua translocação para o núcleo e medeiam fosforilação de CREB?

d) Os efeitos modulatórios de Gal-4 ocorrem via direto bloqueio a receptores glutamatérgicos e dopaminérgicos?

A elucidação dessas questões poderá contribuir para a caracterização da Gal-4 como um possível novo alvo molecular e terapêutico para distúrbios cognitivos e/ou emocionais.

9 REFERÊNCIAS

ADVEDISSIAN, T. et al. E-cadherin dynamics is regulated by galectin-7 at epithelial cell surface. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 30 nov. 2017.

ACHARJEE, A. et al. Immune infiltration and prognostic and diagnostic use of LGALS4 in colon adenocarcinoma and bladder urothelial carcinoma. *PubMed*, 1 jan. 2021.

AL JOWF, G. I. et al. A Public Health Perspective of Post-Traumatic Stress Disorder. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 11, p. 6474, 26 maio 2022.

ALTUNKAYNAK, Y. et al. Cognitive Functioning and Silent Neurological Manifestations in Behçet's Disease with Ocular Involvement. *Noro Psikiyatri Arsivi*, 14 set. 2017.

ALVES, P. M. et al. Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Pathology - Research and Practice*, v. 207, n. 4, p. 236–240, 16 mar. 2011.

AMINORROAYA A.; ABOYANS, V. The interplay of psychosocial and neurological disorders with cardiovascular risk. *European Journal of Preventive Cardiology*, v. 32, n. 6, p. 427–429, 1 abr. 2025.

ANAND, S.; MUKHERJEE, K.; PADMANABHAN, P. Morphological analysis of *Spirulina* sp. NCIM 5143 and *Nostoc ellipsosporum* NCIM 2786 and comparative characterization of associated enzymes through in silico approach. *Biologia*, 8 jun. 2020.

AVERILL, L. A. et al. Prefrontal Glutamate Neurotransmission in PTSD: A Novel Approach to Estimate Synaptic Strength in Vivo in Humans. *Chronic Stress*, v. 6, p. 247054702210927, jan. 2022.

BAHRANI E. et al. Cutaneous Adverse Effects of Neurologic Medications. *CNS Drugs*, v. 30, n. 3, p. 245–267, 25 fev. 2016.

BAILEY, D.; BARRECA, C.; O'HARE, P. Trafficking of the bZIP Transmembrane Transcription Factor CREB-H into Alternate Pathways of ERAD and Stress-Regulated Intramembrane Proteolysis. *Traffic*, v. 8, n. 12, p. 1796–1814, 17 set. 2007.

BARONDES, S. H. Stumbling on galectins. *Galectins*, 1-8, 2008.

BATHINA, S.; DAS, U. N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of Medical Science*, v. 11, n. 6, p. 1164–1178, 2015.

BAY, A. E. P. et al. Galectin-4-mediated transcytosis of transferrin receptor. *Journal of Cell Science*, 1 jan. 2014.

BELO, A. I. et al. Galectin-4 Reduces Migration and Metastasis Formation of Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. e65957–e65957, 18 jun. 2013.

BHATT, M. et al. Unveiling the crucial role of betaine: modulation of GABA homeostasis via SLC6A1 transporter (GAT1). *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 81, n. 1, 17 jun. 2024.

BI, D. et al. GABAergic dysfunction in excitatory and inhibitory (E/I) imbalance drives the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Alzheimers & Dementia*, v. 16, n. 9, p. 1312–1329, 1 set. 2020.

BJORKLUND, M., KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1755, n. 1, p. 37–69, 25 maio 2005.

BLIDNER, A. G. et al. Re-wiring regulatory cell networks in immunity by galectin-glycan interactions. *FEBS Letters*, v. 589, n. 22, p. 3407–3418, 6 set. 2015.

BOLSONI, L. M. et al. Effects of cannabidiol on symptoms induced by the recall of traumatic events in patients with posttraumatic stress disorder. *Psychopharmacology*, v. 239, n. 5, p. 1499–1507, 14 jan. 2022.

BOZA-SERRANO, A.; et al. Galectin-3, a novel endogenous TREM2 ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, v. 138, p. 251-273, 2019.

BOZA-SERRANO, A. et al. Galectin-3 is elevated in CSF and is associated with A β deposits and tau aggregates in brain tissue in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, v. 144, n. 5, p. 843–859, 27 jul. 2022.

BRESSAN, R. A.; PILOWSKY, L. S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 25, n. 3, p. 177–183, 2003.

BRINI, M. et al. Neuronal Calcium signaling: Function and Dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 71, n. 15, p. 2787–2814, 19 jan. 2014.

BROCCA, M. E. et al. Normal Cortical Myelination in Galectin-4-Deficient Mice. *Cells*, v. 11, n. 21, p. 3485, 3 nov. 2022.

BROMET, E. J. et al. Post-traumatic stress disorder associated with natural and human-made disasters in the World Mental Health Surveys. *Psychological Medicine*, v. 47, n. 2, p. 227–241, 30 ago. 2016.

BUM-ERDENE, K. et al. Structural characterisation of human galectin-4 N-terminal carbohydrate recognition domain in complex with glycerol, lactose, 3'-sulfo-lactose and 2'-fucosyllactose. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 1 fev. 2016.

BURGUILLOS, M. A. et al. Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation. *Cell Reports*, v. 10, n. 9, p. 1626–1638, 1 mar. 2015.

CAI, Z. et al. Galectin-4 serves as a prognostic biomarker for the early recurrence / metastasis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, v. 105, n. 11, p. 1510–1517, 27 out. 2014.

CAIRE, M. J.; VARACALLO, M.; REDDY, V. Physiology, Synapse. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526047/>>.

CANNON, J. R.; GREENAMYRE, J. T. The Role of Environmental Exposures in Neurodegeneration and Neurodegenerative Diseases. *Toxicological Sciences*, v. 124, n. 2, p. 225–250, 13 set. 2011.

CAPUTO, S. et al. Galectin-3 in Prostate Cancer Stem-Like Cells Is Immunosuppressive and Drives Early Metastasis. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 10 set. 2020.

CARLEZONJR, W.; DUMAN, R.; NESTLER, E. The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*, v. 28, n. 8, p. 436–445, ago. 2005.

CASTELLANO, C. et al. Post-training systemic and intra-amygdala administration of the GABA-B agonist baclofen impairs retention. v. 52, n. 2, p. 170–179, 1 set. 1989.

CHAN, Y.-C. et al. Dissecting the Structure–Activity Relationship of Galectin–Ligand Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 2, p. 392–392, 29 jan. 2018.

CHAN, Z. C.; OENTARYO, M. J.; LEE, C. W. MMP-mediated modulation of ECM environment during axonal growth and NMJ development. *Neuroscience letters*, v. 724, p. 134822–134822, 1 abr. 2020.

CHEN R. J., SHARMA S. GABA Receptor. [Updated 2025 Feb 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526124/>>.

CHIPMAN, P. H. et al. NMDAR-dependent presynaptic homeostasis in adult hippocampus: Synapse growth and cross-modal inhibitory plasticity. *Neuron*, v. 110, n. 20, p. 3302–3317.e7, 1 out. 2022.

CENGİZ, T. et al. The roles of galectin-3 and galectin-4 in the idiopathic Parkinson disease and its progression. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 184, p. 105373, set. 2019.

CHANG, C. .; MAREN, S. Early extinction after fear conditioning yields a context-independent and short-term suppression of conditional freezing in rats. *Learning & Memory*, v. 16, n. 1, p. 62–68, 7 jan. 2009.

CHAAAYA, N. et al. Contextual Fear Conditioning Alter Microglia Number and Morphology in the Rat Dorsal Hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 13, 14 maio 2019.

CHEN, H.-Y. et al. Galectins as bacterial sensors in the host innate response. *Current Opinion in Microbiology*, v. 17, p. 75–81, fev. 2014.

CHEN, Y.-C. et al. Galectin-3 Negatively Regulates Hippocampus-Dependent Memory Formation through Inhibition of Integrin Signaling and Galectin-3 Phosphorylation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 10, 11 jul. 2017.

CHEN, F. et al. Hippocampal Galectin-3 knockdown alleviates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and cognitive deficits by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling in aged mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 936, p. 175360, dez. 2022.

CHEN, F. et al. Hippocampal Galectin-3 knockdown alleviates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and cognitive deficits by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling in aged mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 936, p. 175360, dez. 2022.

CHEN, S. et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 1–35, 22 maio 2023.

COHEN, J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2. ed. Hillsdale, N.J.: Lawrence Erlbaum Associates, 1988.

CUMMINGS, R. D. et al. Galectins. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579987/>.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *The Journal of Pathology*, v. 189, n. 3, p. 300–308, nov. 1999.

DABILGOU, A. A. et al. Multicentric study of adherence to antiseizure medications among adults with epilepsy attended in neurology departments in Burkina Faso. *Epilepsia Open*, v. 10, n. 1, p. 168–176, 11 nov. 2024.

DA ROSA, M. M. et al. Alzheimer's disease: Is there a role for galectins? *European Journal of Pharmacology*, v. 909, p. 174437–174437, 24 ago. 2021.

DAM, T. K.; BREWER, C. F. Lectins as pattern recognition molecules: The effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology*, v. 20, n. 3, p. 270–279, 24 nov. 2009.

DAVIS, K. et al. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *American Journal of Psychiatry*, v. 148, n. 11, p. 1474–1486, nov. 1991.

DAVIS, M.; MYERS, K. M. The role of glutamate and Gamma-Aminobutyric acid in fear extinction: clinical implications for exposure therapy. *Biological Psychiatry*, v. 52, n. 10, p. 998–1007, nov. 2002.

DA SILVA, H. C. et al. The role of childhood cumulative trauma in the risk of lifetime PTSD: an epidemiological study. *Psychiatry research*, v. 336, p. 115887–115887, 1 jun. 2024.

DE JONG, C. G. H. M. et al. Galectin-4, a Negative Regulator of Oligodendrocyte Differentiation, Is Persistently Present in Axons and Microglia/Macrophages in Multiple Sclerosis Lesions. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 77, n. 11, p. 1024–1038, 24 ago. 2018.

DELL'OSTE, V. et al. Metabolic and Inflammatory Response in Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD): A Systematic Review on Peripheral Neuroimmune Biomarkers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 20, n. 4, p. 2937, 8 fev. 2023.

DESTA, I. T. et al. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure*, v. 28, n. 9, p. 1071-1081.e3, set. 2020.

DEVYLDER, J.; LALANE, M.; FEDINA, L. The Association Between Abusive Policing and PTSD Symptoms Among U.S. Police Officers. *Journal of the Society for Social Work and Research*, v. 10, n. 2, p. 261–273, jun. 2019.

DIEDEN, A. et al. Galectin-4 is associated with diabetes and obesity in a heart failure population. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, 20 nov. 2023.

DÍEZ-REVUELTA, N. et al. Neurons define non-myelinated axon segments by the regulation of galectin-4-containing axon membrane domains. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 25 set. 2017.

DING, Y. et al. LGALS4 as a Prognostic Factor in Urothelial Carcinoma of Bladder Affects Cell Functions. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 18, 1 jan. 2019.

DUAN, H. et al. Targeting the CD146/Galectin-9 axis protects the integrity of the blood–brain barrier in experimental cerebral malaria. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 18, n. 10, p. 2443–2454, 17 nov. 2020.

DUMAN, R. S.; SANACORA, G.; KRYSTAL, J. H. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron*, v. 102, n. 1, p. 75–90, abr. 2019.

DRIGO, Edmara dos Santos. *Análise Da Comunicação No Setor Operacional Usando Equações Estruturais: Uma Ferramenta De Apoio Ao Gerenciamento Da Informação*. 2021.

ELSLIGER, M. -A. ; WILSON, I. A. 1.8 Structure Validation and Analysis. Elsevier eBooks, p. 116–135, 1 jan. 2012.

ERLANGSEN, A. et al. Association Between Neurological Disorders and Death by Suicide in Denmark. JAMA, v. 323, n. 5, p. 444, 4 fev. 2020.

FEDUCCIA, A. A. et al. Breakthrough for Trauma Treatment: Safety and Efficacy of MDMA-Assisted Psychotherapy Compared to Paroxetine and Sertraline. Frontiers in Psychiatry, v. 10, n. 650, 12 set. 2019.

FELES, S. et al. Streamlining Culture Conditions for the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: A Prerequisite for Functional Studies. Methods and Protocols, v. 5, n. 4, p. 58, 12 jul. 2022.

FEIGIN, V. L. et al. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. The Lancet Neurology, v. 19, n. 3, p. 255–265, mar. 2020.

FINKBEINER, S. et al. CREB: A Major Mediator of Neuronal Neurotrophin Responses. Neuron, v. 19, n. 5, p. 1031–1047, 1 nov. 1997.

FONZO, G. A. Diminished positive affect and traumatic stress: A biobehavioral review and commentary on trauma affective neuroscience. Neurobiology of Stress, v. 9, p. 214–230, nov. 2018.

FERREIRA, Manoela de Aguiar. Um estudo sobre galectinas 1, 3, 4 e PAR-4 na modulação da memória de medo. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

GABIUS, H.-J. Animal Lectins. European Journal of Biochemistry, v. 243, n. 3, p. 543–576, fev. 1997.

GABRIEL, Y. et al. RELAÇÃO DE GALECTINA 4 E ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. *Inova Saúde*, v. 14, n. 5, p. 105–114, 28 jun. 2024.

GALDINO, Lília Vieira. Caracterização dos níveis séricos e expressão tecidual da galectina-12 em neoplasias HPB. 2021. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

GOMES, C. C. M. et al. O PAPEL DAS GALECTINAS NA INFLAMAÇÃO E MIELINIZAÇÃO EM DISFUNÇÕES COGNITIVAS DE DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS. *Inova Saúde*, v. 14, n. 5, p. 173–181, 28 jun. 2024.

GOSSELIN, R.-D. Beware of so-called “good” correlations: a statistical reality check on individual mRNA-protein predictions. *arXiv (Cornell University)*, 5 jan. 2025.

GIAMBARBERI, L.; MUNGER CLARY, H. M. Suicide and Epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17 jun. 2022.

GIBBS, R. M. et al. Toward Precision Medicine for Neurological and Neuropsychiatric Disorders. *Cell Stem Cell*, v. 23, n. 1, p. 21–24, jul. 2018.

GITT, M. A. et al. Galectin-4 and Galectin-6 Are Two Closely Related Lectins Expressed in Mouse Gastrointestinal Tract. v. 273, n. 5, p. 2954–2960, 1 jan. 1998.

GIRAULT, J.-A.; GREENGARD, P. The neurobiology of dopamine signaling. *Archives of neurology*, v. 61, n. 5, p. 641–4, 2004.

GOMES, G. M. et al. Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 93, n. 4, p. 589–595, 4 mar. 2010.

GREZENKO, H. et al. Epigenetics in Neurological and Psychiatric Disorders: A Comprehensive Review of Current Understanding and Future Perspectives. *Cureus*, v. 15, n. 8, p. e43960, 2023.

GUO, W.; GIANCOTTI, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, n. 10, p. 816–826, out. 2004.

HACHISU, K. et al. Galectin-4 Is Involved in the Structural Changes of Glycosphingolipid Glycans in Poorly Differentiated Gastric Cancer Cells with High Metastatic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 15, p. 12305–12305, 1 ago. 2023.

HAIR, J. et al. A primer on partial least squares structural equation modeling (PLS-SEM). Sage publications, 2016.

HALT, A. R. et al. CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *The EMBO Journal*, v. 31, n. 5, p. 1203–1216, 10 jan. 2012.

HAMMEL, G. et al. Consequences and mechanisms of myelin debris uptake and processing by cells in the central nervous system. *Cellular Immunology*, v. 380, p. 104591, 1 out. 2022.

HASSAN, F. E. et al. Evaluating the protective role of trimetazidine versus nano-trimetazidine in amelioration of bilateral renal ischemia/reperfusion induced neuro-degeneration: Implications of ERK1/2, JNK and Galectin-3/NF- κ B/TNF- α /HMGB-1 signaling. **Tissue and Cell**, v. 85, p. 102241, 2023.

HE, J.; BAUM, L. G. Galectin Interactions with Extracellular Matrix and Effects on Cellular Function. *Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology*, p. 247–256, 1 jan. 2006.

HENAO, M. C. et al. Translocating Peptides of Biomedical Interest Obtained from the Spike (S) Glycoprotein of the SARS-CoV-2. *Membranes*, v. 12, n. 6, p. 600, 1 jun. 2022.

HESDORFFER, D. C. Comorbidity between neurological illness and psychiatric disorders. *CNS Spectrums*, v. 21, n. 3, p. 230–238, 22 fev. 2016.

HENDERSON, N. C.; SETHI, T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological Reviews*, v. 230, n. 1, p. 160–171, jul. 2009.

HIRABAYASHI, J. et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1572, n. 2-3, p. 232–254, set. 2002.

HONG, S.-H. et al. Galectin-4 Interaction with CD14 Triggers the Differentiation of Monocytes into Macrophage-like Cells via the MAPK Signaling Pathway. *Immune Network*, v. 19, n. 3, 1 jan. 2019.

HU, D. et al. Galectin 4 is a biomarker for early recurrence and death after surgical resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 54, n. 1, p. 95–100, 2 jan. 2019.

HUANG, J. et al. Involvement of the GABAergic system in PTSD and its therapeutic significance. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 16, 1 fev. 2023.

HUANG, S.-Y.; ZOU, X. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, n. 8, p. 3016–3034, 18 ago. 2010.

HUFFELS, C.F.M., MIDDELDORP, J. & HOL, E.M. A β Pathology and Neuron–Glia Interactions: A Synaptocentric View. *Neurochem Res* 48, 1026–1046 (2023).

HUGHES, R. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1473, n. 1, p. 172–185, 17 dez. 1999.

HUNT, D. L.; CASTILLO, P. E. Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 22, n. 3, p. 496–508, jun. 2012.

JACOB, R.; GOREK, L.-S. Intracellular galectin interactions in health and disease. *Seminars in Immunopathology*, v. 46, n. 1-2, jul. 2024.

JAN, H.-M. et al. Galectin-4 Antimicrobial Activity Primarily Occurs Through its C-Terminal Domain. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 23, n. 5, p. 100747–100747, 13 mar. 2024.

JIANG, M. et al. Adverse Reactions Associated with Intravenous Immunoglobulin Administration in the Treatment of Neurological Disorders: A Systematic Review. v. 184, n. 6, p. 513–528, 1 jan. 2023.

JUJIC, A. et al. Plasma Galectin-4 Levels Are Increased after Stroke in Mice and Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 12, p. 10064–10064, 13 jun. 2023.

JUNAID FARRUKH, M. et al. Medication adherence status among patients with neurological conditions and its association with quality of life. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 29, n. 5, abr. 2021.

KABAŁA, K.; JANICKA, M. Relationship between the GABA Pathway and Signaling of Other Regulatory Molecules. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 19, p. 10749, 6 out. 2024.

KAMILI, N. A. et al. Key regulators of galectin–glycan interactions. *PROTEOMICS*, v. 16, n. 24, p. 3111–3125, 1 set. 2016.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular Brain*, v. 5, n. 1, p. 14, 2012.

KANDEL, E. R; SCHWARTZ, J. *Princípios de Neurociências*. 5 ed. Porto Alegre:AMGH, 2014.

KANG, H. Sample Size Determination and Power Analysis Using the G*Power Software. *Journal of Educational Evaluation for Health Professions*, v. 18, n. 17, p. 17, 30 jul. 2021.

KASHIHARA, K. et al. D1/D2 receptor synergism on CREB DNA-binding activities in the caudate-putamen of rat. *Neurological Research*, v. 21, n. 8, p. 781–784, dez. 1999.

KISS, T. et al. Galectin-1 as a marker for microglia activation in the aging brain. *Brain Research*, v. 1818, p. 148517, nov. 2023.

KIM, S. W. et al. Abrogation of galectin-4 expression promotes tumorigenesis in colorectal cancer. *Cellular Oncology*, v. 36, n. 2, p. 169–178, 2 fev. 2013.

KOENEN, K. C. et al. Posttraumatic stress disorder in the World Mental Health Surveys. *Psychological Medicine*, v. 47, n. 13, p. 2260–2274, 7 abr. 2017.

KOLOBOVNIKOVA, Y. V. et al. Expression of Galectins-1 and Galectin-3 in Stomach and Colorectal Cancer with Tissue Eosinophilia. *Bulletin of experimental biology and medicine*, v. 165, n. 2, p. 256–258, 1 jun. 2018.

KORDUNER, J. et al. Galectin-4 levels in hospitalized versus non-hospitalized subjects with obesity: the Malmö Preventive Project. *Cardiovascular Diabetology*, v. 21, n. 1, 2 jul. 2022.

KOZAKOV, D. et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols*, v. 12, n. 2, p. 255–278, 12 jan. 2017.

KMITA, H.; PINNA, G.; LUSHCHAK, V. I. Potential oxidative stress related targets of mitochondria-focused therapy of PTSD. *Frontiers in Physiology*, v. 14, 13 nov. 2023.

KRUK, L. et al. Galectin functions in cancer-associated inflammation and thrombosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 10, 17 fev. 2023.

LAHM, H. et al. Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconjugate journal*, v. 20, n. 4, p. 227–238, 2004.

LEE, E.; CHUNG, W.-S. Glial Control of Synapse Number in Healthy and Diseased Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 13, 13 fev. 2019.

LEE, I. G. et al. Galectin-4 increases the ability of M2 macrophages to enhance antiviral CD4⁺ T-cell responses. *Journal of leukocyte biology*, v. 113, n. 1, p. 71–83, 2023.

LEE, J. M. et al. Control of protein stability by post-translational modifications. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 201, 13 jan. 2023.

LEVY, Y. et al. It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin. *Glycobiology*, v. 16, n. 6, p. 463–476, 24 fev. 2006.

LI, J. et al. Tumor necrosis factor- α -primed mesenchymal stem cell-derived exosomes promote M2 macrophage polarization via Galectin-1 and modify intrauterine adhesion on a novel murine model. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 16 dez. 2022.

LIJFFIJT, M. et al. A Proof-of-Mechanism Study to Test Effects of the NMDA Receptor Antagonist Lanicemine on Behavioral Sensitization in Individuals With Symptoms of PTSD. *Frontiers in Psychiatry*, v. 10, 13 dez. 2019.

LIU, Y.; ZHAO, J.; GUO, W. Emotional Roles of Mono-Aminergic Neurotransmitters in Major Depressive Disorder and Anxiety Disorders. *Frontiers in Psychology*, v. 9, n. 2201, 21 nov. 2018.

LISMAN, J. Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 358, n. 1432, p. 829–842, 29 abr. 2003.

LIU, J. J. et al. Regulation of monoamine transporters and receptors by lipid microdomains: implications for depression. *Neuropsychopharmacology*, v. 43, n. 11, p. 2165–2179, 28 jun. 2018.

LIU, F.-T.; STOWELL, S. R. The role of galectins in immunity and infection. *Nature Reviews Immunology*, 16 jan. 2023.

LIU, F.-T.; YANG, R.-Y.; HSU, D. K. Galectins in acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1253, n. 1, p. 80–91, 13 fev. 2012.

LONZE, B. E.; GINTY, D. D. Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron*, v. 35, n. 4, p. 605–623, ago. 2002.

LOPES F. F. et al. RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. v. 31, n. 4, p. 545–559, 2 fev. 2017.

LUDWIG, P. E.; M DAS, J. Histology, Glial Cells. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441945/>>.

LV, R.; BAO, Q.; LI, Y. Regulation of M1-type and M2-type macrophage polarization in RAW264.7 cells by Galectin-9. *Molecular Medicine Reports*, v. 16, n. 6, p. 9111–9119, 4 out. 2017.

MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends in Neurosciences*, v. 16, n. 12, p. 521–527, dez. 1993.

MAGEE, J. C.; GRIENBERGER, C. Synaptic Plasticity Forms and Functions. *Annual Review of Neuroscience*, v. 43, n. 1, 19 fev. 2020.

MAO, L.; TANG, Q.; WANG, J. Q. Protein kinase C-regulated cAMP response element-binding protein phosphorylation in cultured rat striatal neurons. *Brain research bulletin*, v. 72, n. 4-6, p. 302–308, 30 maio 2007.

MARAZZITI, D. et al. Novel Pharmacological Targets of Post-Traumatic Stress Disorders. *Life*, v. 13, n. 8, p. 1731–1731, 11 ago. 2023.

MARQUES, T. M. et al. Cerebrospinal Fluid Galectin-1 Levels Discriminate Patients with Parkinsonism from Controls. *Molecular Neurobiology*, v. 56, n. 7, p. 5067–5074, 21 nov. 2018.

MARTY, S. et al. GABAergic Stimulation Regulates the Phenotype of Hippocampal Interneurons through the Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Neuron*, v. 16, n. 3, p. 565–570, mar. 1996.

MASOUDNIA, E.; FARMANI, F. R. Psychosocial Etiology of Post-traumatic Stress Disorder caused by War Trauma among Iran-Iraq War Immigrants in Mehran, Iran. *Journal of Migration and Health*, p. 100225–100225, 1 jan. 2024.

MCCORMICK, A. V. et al. Dopamine D2 Receptor Antagonism Suppresses Tau Aggregation and Neurotoxicity. *Biological Psychiatry*, v. 73, n. 5, p. 464–471, mar. 2013.

MCGAUGH, J. L.; CASTELLANO, C.; BRIONI, J. Picrotoxin enhances latent extinction of conditioned fear. *Behavioral Neuroscience*, v. 104, n. 2, p. 264–267, 1990.

MICHOPOULOS, V.; NORRHOLM, S. D.; JOVANOVIC, T. Diagnostic Biomarkers for Posttraumatic Stress Disorder: Promising Horizons from Translational Neuroscience Research. *Biological Psychiatry*, v. 78, n. 5, p. 344–353, set. 2015.

MIELCZAREK-PALACZ, A. et al. The role of galectins-1, 3, 7, 8 and 9 as potential diagnostic and therapeutic markers in ovarian cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, v. 25, n. 5, 15 mar. 2022.

MIJAILOVIĆ, N. R. et al. Galectin-3 Involvement in Cognitive Processes for New Therapeutic Considerations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 16, 5 jul. 2022.

MIKICS, E. et al. The role of GluN2B-containing NMDA receptors in short- and long-term fear recall. *Physiology & Behavior*, v. 177, p. 44–48, ago. 2017.

MILLS, A. Health Care Systems in Low- and Middle-Income Countries. *New England Journal of Medicine*, v. 370, n. 6, p. 552–557, 6 fev. 2014.

MINIC JANICIJEVIC, S. et al. Galectin-3 mediated risk of inflammation in stable schizophrenia, with only possible secondary consequences for cognition. *World Journal of Psychiatry*, v. 12, n. 9, p. 1183–1193, 19 set. 2022.

MITCHELL, J. M. et al. MDMA-assisted Therapy for Moderate to Severe PTSD: a randomized, placebo-controlled Phase 3 Trial. *Nature Medicine*, v. 29, n. 29, p. 1–8, 14 set. 2023.

MITTAL, D. et al. Stigma associated with PTSD: perceptions of treatment seeking combat veterans. *Psychiatric Rehabilitation Journal*, v. 36, n. 2, p. 86–92, 2013.

MODENUTTI, C. P. et al. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design. *Frontiers in Chemistry*, v. 7, 3 dez. 2019.

MÜLLER, Norbert; ACKENHEIL, Manfred. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 22, n. 1, p. 1-33, 1998.

NABI, I. R.; et al. The galectin lattice at a glance. *Journal of cell science*, v. 128, n. 13, p. 2213-2219, 2015.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Inhibition of Human Cancer Cell Growth and Metastasis in Nude Mice by Oral Intake of Modified Citrus Pectin. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, v. 94, n. 24, p. 1854–1862, 18 dez. 2002.

NASIR, M. et al. Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA Psychopharmacology. *Frontiers in Psychiatry*, v. 11, 19 nov. 2020.

NEGEDU, M. N.; DUCKWORTH, C. A.; YU, L.-G. Galectin-2 in Health and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 1, p. 341–341, 25 dez. 2022.

NICKEL, W. Unconventional Secretory Routes: Direct Protein Export Across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *Traffic*, v. 6, n. 8, p. 607–614, ago. 2005.

NOBUMOTO, A. et al. Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. *Glycobiology*, v. 18, n. 9, p. 735–744, 25 jun. 2008.

OCHIENG, J., FURTAK, V., & LUKYANOV. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate journal*, v. 19, n. 7-9, p. 527–535, 2002.

OLDFIELD, T. J.; HUBBARD, R. E. Analysis of Ca geometry in protein structures. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, v. 18, n. 4, p. 324–337, abr. 1994.

OOSTRUM, M. VAN; SCHUMAN, E. M. Understanding the molecular diversity of synapses. *Nature reviews. Neuroscience*, 5 dez. 2024.

OTMAKHOV, N. et al. Forskolin-Induced LTP in the CA1 Hippocampal Region Is NMDA Receptor Dependent. *Journal of Neurophysiology*, v. 91, n. 5, p. 1955–1962, 1 maio 2004.

OZEKI, Y. et al. Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. *Glycobiology*, v. 5, n. 2, p. 255–261, 1995.

PACLIK, D. et al. Galectin-4 Controls Intestinal Inflammation by Selective Regulation of Peripheral and Mucosal T Cell Apoptosis and Cell Cycle. *PLoS ONE*, v. 3, n. 7, p. e2629, 9 jul. 2008.

PARSONS, C. G.; STÖFFLER, A.; DANYSZ, W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*, v. 53, n. 6, p. 699–723, nov. 2007.

PASCUAL, O. et al. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 4, p. E197–E205, 13 dez. 2011.

PEINADO, H.; PORTILLO, F.; CANO, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 48, n. 5-6, p. 365–375, 2004.

PEIXOTO, L. C.; DA ROSA, M. M. New perspectives on galectin in major depressive disorder treatment. *Biochemical Pharmacology*, v. 233, p. 116786, mar. 2025.

PÉREZ, S.; RIUS-PÉREZ, S. Macrophage Polarization and Reprogramming in Acute Inflammation: A Redox Perspective. *Antioxidants*, v. 11, n. 7, p. 1394, 19 jul. 2022.

PERL, D. P.; OLANOW, C. W.; CALNE, D. Alzheimer's disease and Parkinson's disease: distinct entities or extremes of a spectrum of neurodegeneration? *Annals of Neurology*, v. 44, n. 3 Suppl 1, p. S19-31, 1 set. 1998.

PREMEAUX, T. A. et al. Elevated cerebrospinal fluid Galectin-9 is associated with central nervous system immune activation and poor cognitive performance in older HIV-infected individuals. *Journal of NeuroVirology*, v. 25, n. 2, p. 150–161, 26 nov. 2018.

RABINOVICH et al. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology*, v. 97, n. 1, p. 100–106, maio 1999.

RAI, D. K.; RIEDER, E. Homology Modeling and Analysis of Structure Predictions of the Bovine Rhinitis B Virus RNA Dependent RNA Polymerase (RdRp). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 7, p. 8998–9013, 19 jul. 2012.

RALL, T. W.; SUTHERLAND, E. W. FORMATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE BY TISSUE PARTICLES. *Journal of Biological Chemistry*, v. 232, n. 2, p. 1065–1076, jun. 1958.

RESSLER, K. J. et al. Post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits. *Nature Reviews Neurology*, v. 18, n. 5, p. 273–288, 29 mar. 2022.

ROSSO, I. M. et al. Hippocampus Glutamate and N-Acetyl Aspartate Markers of Excitotoxic Neuronal Compromise in Posttraumatic Stress Disorder. *Neuropsychopharmacology*, v. 42, n. 8, p. 1698–1705, 13 fev. 2017.

ROZO, J. A.; MARTÍNEZ-GALLEGO, I.; RODRÍGUEZ-MORENO, A. Cajal, the neuronal theory and the idea of brain plasticity. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 18, 19 fev. 2024.

RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 14, n. 9, p. 609–625, 14 ago. 2013.

RUSTIGUEL, J. K. et al. Full-length model of the human galectin-4 and insights into dynamics of inter-domain communication. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 19 set. 2016.

SATELLI, A. et al. Galectin-4 functions as a tumor suppressor of human colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, v. 129, n. 4, p. 799–809, 9 dez. 2010.

SCHAFER, D. P.; LEHRMAN, E. K.; STEVENS, B. The “Quad-partite” Synapse: Microglia-Synapse Interactions in the Developing and Mature CNS. *Glia*, v. 61, n. 1, p. 24–36, 1 jan. 2013.

SEDLÁŘ, A. et al. Interaction between Galectin-3 and Integrins Mediates Cell-Matrix Adhesion in Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 10, p. 5144, 13 maio 2021.

SEIDEMANN, R. et al. The Reward System and Post-Traumatic Stress Disorder: Does Trauma Affect the Way We Interact With Positive Stimuli? *Chronic Stress*, v. 5, p. 247054702199600, jan. 2021.

SERPELONI, F. et al. Terapia de exposição narrativa para o tratamento do transtorno de estresse pós-traumático com pessoas que passaram por violência doméstica e comunitária: estudo de série de casos em dois centros de saúde no Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 28, n. 6, p. 1619–1630, jun. 2023.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of Recent Memory after Bilateral Hippocampal Lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 20, n. 1, p. 11–21, 1 fev. 1957.

SCHACTER, D. L., WAGNER, A. D., & BUCKNER, R. L. Memory systems of 1999. In E. Tulving & F. I. M. Craik (Eds.), *The Oxford handbook of memory*, Oxford University Press. p. 627–643, 2000.

SCHUROV, N. et al. Glutamatergic Induction of CREB Phosphorylation and Fos Expression in Primary Cultures of the Suprachiasmatic Hypothalamus *In Vitro* is Mediated by Co-Ordinate Activity of NMDA and Non-NMDA Receptors. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 11, n. 1, p. 43–51, 1 jan. 1999.

SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by A Diverse Array of Extracellular Signals. *Annual Review of Biochemistry*, v. 68, n. 1, p. 821–861, jun. 1999.

SHEPHERD, J. D.; BEAR, M. F. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, v. 14, n. 3, p. 279–284, 1 mar. 2011.

SHIRAKAWA, K. et al. IL (Interleukin)-10–STAT3–Galectin-3 Axis Is Essential for Osteopontin-Producing Reparative Macrophage Polarization After Myocardial Infarction. *Circulation*, v. 138, n. 18, p. 2021–2035, 30 out. 2018.

SHER, P. K. 2-APV and DGAMS are superior to MK-801 in preventing hypoxia-induced injury to developing neurons in vitro. *Pediatric Neurology*, v. 7, n. 6, p. 429–435, nov. 1991.

SHIN, T. The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: A review. *Acta Histochemica*, v. 115, n. 5, p. 407–411, 8 jan. 2013.

SHIPLEY, M. M.; MANGOLD, C. A.; SZPARA, M. L. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments*, v. 108, n. 108, 17 fev. 2016.

SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. GABA: Homeostatic and pharmacological aspects. *Progress in Brain Research*, p. 9–19, 2007.

SILVA, Eduardo Davi Lima da. Galectina-9 como biomarcador de severidade em pacientes com COVID-19 leve e grave: implicações imunológicas e clínicas. 2024. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, v. 99, n. 2, p. 195–231, 1992.

STAJIC, D. et al. The role of galectin-3 in modulation of anxiety state level in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 78, p. 177–187, maio 2019.

STANCIC, M. et al. Galectin-4, a novel neuronal regulator of myelination. *Glia*, v. 60, n. 6, p. 919–935, 19 mar. 2012.

STAROSSOM, S. C. et al. Galectin-1 Deactivates Classically Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration. *Immunity*, v. 37, n. 2, p. 249–263, ago. 2012.

STEINMETZ, J. D. et al. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Neurology*, 23(4), 344–381, 2024.

STOWELL, S. R. et al. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nature Medicine*, v. 16, n. 3, p. 295–301, 14 fev. 2010.

SU, J. et al. Galectin-13, a different prototype galectin, does not bind β -galactosides and forms dimers via intermolecular disulfide bridges between Cys-136 and Cys-138. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 17 jan. 2018.

SUN, Y.-Y. et al. Surface expression of hippocampal NMDA GluN2B receptors regulated by fear conditioning determines its contribution to memory consolidation in adult rats. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 4 ago. 2016.

SUNDBLAD, V. et al. Galectins in Intestinal Inflammation: Galectin-1 Expression Delineates Response to Treatment in Celiac Disease Patients. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 1 mar. 2018.

SZAFLARSKI, W. et al. Nuclear localization of P-glycoprotein is responsible for protection of the nucleus from doxorubicin in the resistant LoVo cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 67, n. 6, p. 497–502, 3 abr. 2013.

TAKENAKA, Y. et al. Nuclear Export of Phosphorylated Galectin-3 Regulates Its Antiapoptotic Activity in Response to Chemotherapeutic Drugs. *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, n. 10, p. 4395–4406, 15 maio 2004.

TEICHBERG, V. I. et al. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 72, n. 4, p. 1383–1387, 1 abr. 1975.

TELCH, M. J. et al. Use of Cannabidiol (CBD) oil in the treatment of PTSD: Study design and rationale for a placebo-controlled randomized clinical trial. *Contemporary Clinical Trials*, v. 122, p. 106933, nov. 2022.

THIJSEN, V. L.; RABINOVICH, G. A.; GRIFFIOEN, A. W. Vascular galectins: Regulators of tumor progression and targets for cancer therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 24, n. 6, p. 547–558, dez. 2013.

THOMPSON-HOLLANDS, J. et al. Veterans with poor PTSD treatment adherence: Exploring their loved ones' experience of PTSD and understanding of PTSD treatment. *Psychological Services*, v. 18, n. 2, 22 ago. 2019.

TRONCOSO, M. F. et al. The universe of galectin-binding partners and their functions in health and disease. *Journal of biological chemistry*/~The æJournal of biological chemistry, v. 299, n. 12, p. 105400–105400, 1 dez. 2023.

TURRIGIANO, G. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n. 1, p. a005736, 1 jan. 2012.

TZINGOUNIS, A. V.; NICOLL, R. A. Arc/Arg3.1: Linking Gene Expression to Synaptic Plasticity and Memory. *Neuron*, v. 52, n. 3, p. 403–407, nov. 2006.

VAN DER KOLK, Bessel A.; BURBRIDGE, Jennifer A.; SUZUKI, Joji. The psychobiology of traumatic memory. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 821, n. 1, p. 99-113, 1997.

VASTA, G. R. Galectins as Pattern Recognition Receptors: Structure, Function, and Evolution. *Springer eBooks*, p. 21–36, 1 jan. 2012.

VELASCO, S. M. et al. Neuronal Galectin-4 is required for axon growth and for the organization of axonal membrane L1 delivery and clustering. *Journal of Neurochemistry*, v. 125, n. 1, p. 49–62, 1 abr. 2013.

VOET, S.; PRINZ, M.; VAN LOO, G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends in Molecular Medicine*, v. 25, n. 2, p. 112–123, 1 fev. 2019.

YANG, D. et al. Genetic Deletion of Galectin-3 Inhibits Pancreatic Cancer Progression and Enhances the Efficacy of Immunotherapy. *Gastroenterology*, v. 167, n. 2, p. 298–314, 1 jul. 2024.

YANG, R.-Y. et al. Cell Cycle Regulation by Galectin-12, a New Member of the Galectin Superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 23, p. 20252–20260, 30 mar. 2001.

YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 10, jun. 2008.

YANG, J. et al. T cell-mediated skin-brain axis: Bridging the gap between psoriasis and psychiatric comorbidities. *Journal of Autoimmunity*, v. 144, p. 103176, 15 fev. 2024.

YOSHII, T. et al. Galectin-3 Phosphorylation Is Required for Its Anti-apoptotic Function and Cell Cycle Arrest. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 9, p. 6852–6857, mar. 2002.

WANG, Y.-J. et al. Functional Expression of NMDA Receptors in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Following Long-Term RA/BDNF-Induced Differentiation. *NeuroSci*, v. 6, n. 2, p. 47–47, 26 maio 2025.

WANG, J. et al. Galectin-1-secreting neural stem cells elicit long-term neuroprotection against ischemic brain injury. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 9621, 2015.

WANG, X. et al. Increased ileal bile acid binding protein and galectin-9 are associated with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatric Research*, v. 119, p. 102-106, 2019.

WU, M.-H. et al. Galectin-1-Mediated Tumor Invasion and Metastasis, Up-Regulated Matrix Metalloproteinase Expression, and Reorganized Actin Cytoskeletons. v. 7, n. 3, p. 311–318, 1 mar. 2009.

ZEPF, S.; ZEPF, F. D. Trauma and traumatic neurosis: Freud's concepts revisited. The International Journal of Psychoanalysis, v. 89, n. 2, p. 331–353, abr. 2008.

ZHU, G. et al. MPTP modulates hippocampal synaptic transmission and activity-dependent synaptic plasticity via dopamine receptors. Journal of Neurochemistry, v. 122, n. 3, p. 582–593, 22 jun. 2012.

MATERIAL SUPPLEMENTAR S1			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	75	Center	-1029.5
0	75	Lowest Energy	-1029.5
1	58	Center	-929.2
1	58	Lowest Energy	-995.1
2	57	Center	-843.5
2	57	Lowest Energy	-970.0
3	44	Center	-978.2
3	44	Lowest Energy	-978.2
4	43	Center	-857.6
4	43	Lowest Energy	-973.6
5	42	Center	-967.9
5	42	Lowest Energy	-967.9
6	41	Center	-1004.0
6	41	Lowest Energy	-1004.0
7	40	Center	-990.1
7	40	Lowest Energy	-1110.2
8	36	Center	-879.6
8	36	Lowest Energy	-958.1
9	31	Center	-851.2
9	31	Lowest Energy	-953.4
10	30	Center	-909.6
10	30	Lowest Energy	-920.0
11	30	Center	-934.6
11	30	Lowest Energy	-934.6
12	24	Center	-909.5
12	24	Lowest Energy	-965.3
13	24	Center	-956.3
13	24	Lowest Energy	-956.8

14	20	Center	-972.7
14	20	Lowest Energy	-972.7
15	19	Center	-835.2
15	19	Lowest Energy	-924.6
16	18	Center	-833.6
16	18	Lowest Energy	-926.2
17	17	Center	-931.1
17	17	Lowest Energy	-931.1
18	16	Center	-948.3
18	16	Lowest Energy	-948.3
19	16	Center	-896.2
19	16	Lowest Energy	-896.2
20	16	Center	-866.5
20	16	Lowest Energy	-912.3
21	15	Center	-955.8
21	15	Lowest Energy	-955.8
22	15	Center	-902.3
22	15	Lowest Energy	-902.3
23	13	Center	-923.3
23	13	Lowest Energy	-945.0
24	13	Center	-845.2
24	13	Lowest Energy	-936.8
25	12	Center	-861.6
25	12	Lowest Energy	-861.8
26	11	Center	-932.2
26	11	Lowest Energy	-932.2
27	11	Center	-834.4
27	11	Lowest Energy	-962.7
28	3	Center	-841.9
28	3	Lowest Energy	-841.9

29	2	Center	-878.7
29	2	Lowest Energy	-914.8

MATERIAL SUPPLEMENTAR S2			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	48	Center	-1019.5
0	48	Lowest Energy	-1019.5
1	41	Center	-930.2
1	41	Lowest Energy	-1049.5
2	40	Center	-998.6
2	40	Lowest Energy	-1011.8
3	30	Center	-876.4
3	30	Lowest Energy	-978.3
4	28	Center	-877.5
4	28	Lowest Energy	-975.6
5	27	Center	-1017.4
5	27	Lowest Energy	-1017.4
6	27	Center	-932.8
6	27	Lowest Energy	-1005.5
7	26	Center	-946.2
7	26	Lowest Energy	-1005.9
8	25	Center	-984.8
8	25	Lowest Energy	-984.8
9	24	Center	-997.9
9	24	Lowest Energy	-1101.2
10	23	Center	-889.5
10	23	Lowest Energy	-962.1
11	23	Center	-969.3
11	23	Lowest Energy	-974.3
12	23	Center	-872.3
12	23	Lowest Energy	-1011.7
13	22	Center	-971.6
13	22	Lowest Energy	-981.4

14	22	Center	-1001.3
14	22	Lowest Energy	-1001.3
15	22	Center	-979.8
15	22	Lowest Energy	-979.8
16	21	Center	-1058.9
16	21	Lowest Energy	-1058.9
17	20	Center	-1079.7
17	20	Lowest Energy	-1079.7
18	20	Center	-881.1
18	20	Lowest Energy	-956.6
19	19	Center	-1024.9
19	19	Lowest Energy	-1024.9
20	19	Center	-930.8
20	19	Lowest Energy	-951.2
21	19	Center	-883.2
21	19	Lowest Energy	-927.0
22	18	Center	-888.0
22	18	Lowest Energy	-983.8
23	17	Center	-1069.8
23	17	Lowest Energy	-1069.8
24	15	Center	-932.9
24	15	Lowest Energy	-932.9
25	14	Center	-960.3
25	14	Lowest Energy	-960.3
26	14	Center	-954.3
26	14	Lowest Energy	-954.3
27	14	Center	-940.5
27	14	Lowest Energy	-940.5
28	14	Center	-886.4
28	14	Lowest Energy	-933.4

29	12	Center	-884.6
29	12	Lowest Energy	-1006.9

MATERIAL SUPPLEMENTAR S3				
Cluster	Members		Representative	Weighted Score
0	91		Center	-1528.0
0	91		Lowest Energy	-1528.0
1	82		Center	-1545.6
1	82		Lowest Energy	-1545.6
2	81		Center	-1321.6
2	81		Lowest Energy	-1545.1
3	70		Center	-1367.2
3	70		Lowest Energy	-1666.4
4	69		Center	-1394.0
4	69		Lowest Energy	-1567.2
5	54		Center	-1259.9
5	54		Lowest Energy	-1478.6
6	52		Center	-1306.6
6	52		Lowest Energy	-1579.3
7	49		Center	-1407.1
7	49		Lowest Energy	-1407.1
8	45		Center	-1310.5
8	45		Lowest Energy	-1368.7
9	36		Center	-1382.7
9	36		Lowest Energy	-1382.7
10	30		Center	-1401.7
10	30		Lowest Energy	-1401.7
11	26		Center	-1415.4
11	26		Lowest Energy	-1415.4
12	26		Center	-1335.5
12	26		Lowest Energy	-1351.1
13	22		Center	-1360.5
13	22		Lowest Energy	-1360.5

14	19	Center	-1361.8
14	19	Lowest Energy	-1412.5
15	17	Center	-1317.4
15	17	Lowest Energy	-1322.9
16	15	Center	-1277.0
16	15	Lowest Energy	-1345.1
17	15	Center	-1307.9
17	15	Lowest Energy	-1370.8
18	13	Center	-1252.3
18	13	Lowest Energy	-1358.5
19	13	Center	-1268.1
19	13	Lowest Energy	-1332.5
20	13	Center	-1240.4
20	13	Lowest Energy	-1308.0
21	12	Center	-1293.4
21	12	Lowest Energy	-1318.1
22	12	Center	-1298.5
22	12	Lowest Energy	-1298.5
23	11	Center	-1338.5
23	11	Lowest Energy	-1338.5
24	6	Center	-1256.0
24	6	Lowest Energy	-1327.8
25	5	Center	-1296.1
25	5	Lowest Energy	-1296.1
26	4	Center	-1240.6
26	4	Lowest Energy	-1356.7
27	3	Center	-1243.6
27	3	Lowest Energy	-1311.1

MATERIAL SUPPLEMENTAR S4			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	151	Center	-270.6
0	151	Lowest Energy	-346.9
1	85	Center	-302.7
1	85	Lowest Energy	-321.1
2	70	Center	-269.5
2	70	Lowest Energy	-308.9
3	65	Center	-279.6
3	65	Lowest Energy	-337.6
4	55	Center	-302.4
4	55	Lowest Energy	-314.1
5	52	Center	-310.8
5	52	Lowest Energy	-310.8
6	41	Center	-271.3
6	41	Lowest Energy	-294.1
7	36	Center	-298.5
7	36	Lowest Energy	-298.5
8	30	Center	-277.5
8	30	Lowest Energy	-314.8
9	29	Center	-282.7
9	29	Lowest Energy	-290.0
10	28	Center	-267.9
10	28	Lowest Energy	-319.0
11	24	Center	-268.4
11	24	Lowest Energy	-296.6
12	24	Center	-297.3
12	24	Lowest Energy	-297.3
13	24	Center	-268.1
13	24	Lowest Energy	-310.9

14	23	Center	-273.9
14	23	Lowest Energy	-291.7
15	23	Center	-281.2
15	23	Lowest Energy	-295.7
16	23	Center	-272.1
16	23	Lowest Energy	-321.6
17	22	Center	-290.5
17	22	Lowest Energy	-290.5
18	20	Center	-283.9
18	20	Lowest Energy	-290.4
19	20	Center	-269.2
19	20	Lowest Energy	-299.1
20	18	Center	-278.8
20	18	Lowest Energy	-291.2
21	17	Center	-282.9
21	17	Lowest Energy	-285.6
22	13	Center	-287.8
22	13	Lowest Energy	-287.8
23	13	Center	-287.1
23	13	Lowest Energy	-287.1
24	13	Center	-284.5
24	13	Lowest Energy	-295.8
25	10	Center	-286.7
25	10	Lowest Energy	-286.7
26	10	Center	-279.5
26	10	Lowest Energy	-279.5
27	8	Center	-268.7
27	8	Lowest Energy	-292.5
28	7	Center	-266.8
28	7	Lowest Energy	-282.8

29	7	Center	-272.8
29	7	Lowest Energy	-285.9

MATERIAL SUPPLEMENTAR S5			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	158	Center	-659.2
0	158	Lowest Energy	-818.3
1	105	Center	-646.4
1	105	Lowest Energy	-873.9
2	74	Center	-712.4
2	74	Lowest Energy	-712.4
3	72	Center	-596.0
3	72	Lowest Energy	-880.7
4	62	Center	-621.1
4	62	Lowest Energy	-749.3
5	43	Center	-649.6
5	43	Lowest Energy	-779.1
6	39	Center	-607.0
6	39	Lowest Energy	-775.7
7	28	Center	-662.6
7	28	Lowest Energy	-664.6
8	26	Center	-599.1
8	26	Lowest Energy	-674.7
9	21	Center	-695.9
9	21	Lowest Energy	-695.9
10	20	Center	-602.4
10	20	Lowest Energy	-678.9
11	18	Center	-603.2
11	18	Lowest Energy	-662.1
12	16	Center	-632.9
12	16	Lowest Energy	-759.0
13	15	Center	-655.6
13	15	Lowest Energy	-702.7

14	14	Center	-600.9
14	14	Lowest Energy	-746.6
15	14	Center	-602.8
15	14	Lowest Energy	-664.6
16	14	Center	-604.1
16	14	Lowest Energy	-711.8
17	14	Center	-688.7
17	14	Lowest Energy	-711.5
18	13	Center	-664.9
18	13	Lowest Energy	-664.9
19	12	Center	-666.0
19	12	Lowest Energy	-666.0
20	12	Center	-648.9
20	12	Lowest Energy	-648.9
21	12	Center	-641.4
21	12	Lowest Energy	-688.7
22	11	Center	-631.5
22	11	Lowest Energy	-631.5
23	10	Center	-614.3
23	10	Lowest Energy	-658.3
24	9	Center	-613.2
24	9	Lowest Energy	-632.6
25	8	Center	-595.5
25	8	Lowest Energy	-648.0
26	4	Center	-597.6
26	4	Lowest Energy	-624.6

MATERIAL SUPPLEMENTAR S6			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	213	Center	-794.8
0	213	Lowest Energy	-1132.2
1	196	Center	-792.2
1	196	Lowest Energy	-1056.6
2	109	Center	-802.3
2	109	Lowest Energy	-845.5
3	95	Center	-790.1
3	95	Lowest Energy	-1080.6
4	70	Center	-781.4
4	70	Lowest Energy	-938.8
5	70	Center	-812.9
5	70	Lowest Energy	-835.8
6	65	Center	-752.0
6	65	Lowest Energy	-903.4
7	41	Center	-788.7
7	41	Lowest Energy	-923.2
8	38	Center	-756.4
8	38	Lowest Energy	-1012.9
9	36	Center	-748.6
9	36	Lowest Energy	-892.5
10	33	Center	-748.0
10	33	Lowest Energy	-859.9
11	11	Center	-759.8
11	11	Lowest Energy	-821.6
12	3	Center	-762.4
12	3	Lowest Energy	-762.4

MATERIAL SUPPLEMENTAR S7			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	93	Center	-752.8
0	93	Lowest Energy	-779.9
1	74	Center	-823.1
1	74	Lowest Energy	-875.9
2	70	Center	-704.2
2	70	Lowest Energy	-875.9
3	66	Center	-690.2
3	66	Lowest Energy	-849.7
4	57	Center	-679.8
4	57	Lowest Energy	-946.7
5	56	Center	-681.7
5	56	Lowest Energy	-801.9
6	55	Center	-737.7
6	55	Lowest Energy	-802.4
7	40	Center	-782.8
7	40	Lowest Energy	-782.8
8	37	Center	-751.8
8	37	Lowest Energy	-807.9
9	34	Center	-790.1
9	34	Lowest Energy	-790.1
10	26	Center	-708.5
10	26	Lowest Energy	-733.6
11	26	Center	-690.1
11	26	Lowest Energy	-841.3
12	23	Center	-708.4
12	23	Lowest Energy	-808.5
13	21	Center	-762.4
13	21	Lowest Energy	-809.7

14	17	Center	-687.2
14	17	Lowest Energy	-772.4
15	16	Center	-876.4
15	16	Lowest Energy	-876.4
16	16	Center	-769.1
16	16	Lowest Energy	-769.1
17	14	Center	-779.9
17	14	Lowest Energy	-779.9
18	14	Center	-720.8
18	14	Lowest Energy	-741.4
19	13	Center	-750.0
19	13	Lowest Energy	-806.4
20	13	Center	-808.6
20	13	Lowest Energy	-808.6
21	13	Center	-808.2
21	13	Lowest Energy	-808.2
22	13	Center	-742.1
22	13	Lowest Energy	-742.1
23	13	Center	-702.2
23	13	Lowest Energy	-725.1
24	13	Center	-690.6
24	13	Lowest Energy	-753.1
25	11	Center	-707.0
25	11	Lowest Energy	-762.7
26	11	Center	-708.4
26	11	Lowest Energy	-803.1
27	10	Center	-735.2
27	10	Lowest Energy	-735.2
28	9	Center	-696.0
28	9	Lowest Energy	-750.3

29	8	Center	-723.0
29	8	Lowest Energy	-729.5

MATERIAL SUPPLEMENTAR S8			
Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	117	Center	-208.0
0	117	Lowest Energy	-256.5
1	82	Center	-206.8
1	82	Lowest Energy	-256.0
2	66	Center	-227.0
2	66	Lowest Energy	-244.8
3	63	Center	-251.0
3	63	Lowest Energy	-251.0
4	46	Center	-205.4
4	46	Lowest Energy	-270.1
5	45	Center	-232.9
5	45	Lowest Energy	-247.9
6	44	Center	-205.6
6	44	Lowest Energy	-239.0
7	36	Center	-208.3
7	36	Lowest Energy	-238.5
8	33	Center	-204.0
8	33	Lowest Energy	-239.4
9	32	Center	-208.9
9	32	Lowest Energy	-226.8
10	31	Center	-209.6
10	31	Lowest Energy	-248.0
11	30	Center	-213.8
11	30	Lowest Energy	-241.9
12	27	Center	-213.8
12	27	Lowest Energy	-228.8
13	24	Center	-204.1
13	24	Lowest Energy	-242.2

14	21	Center	-204.5
14	21	Lowest Energy	-235.7
15	19	Center	-228.8
15	19	Lowest Energy	-228.8
16	18	Center	-227.5
16	18	Lowest Energy	-227.5
17	17	Center	-226.4
17	17	Lowest Energy	-226.4
18	16	Center	-240.5
18	16	Lowest Energy	-240.5
19	16	Center	-209.0
19	16	Lowest Energy	-239.5
20	13	Center	-221.8
20	13	Lowest Energy	-234.0
21	12	Center	-235.7
21	12	Lowest Energy	-235.7
22	11	Center	-223.8
22	11	Lowest Energy	-236.2
23	11	Center	-212.5
23	11	Lowest Energy	-222.1
24	11	Center	-226.2
24	11	Lowest Energy	-226.2
25	10	Center	-220.8
25	10	Lowest Energy	-240.9
26	10	Center	-229.9
26	10	Lowest Energy	-229.9
27	9	Center	-205.4
27	9	Lowest Energy	-212.5
28	8	Center	-213.0
28	8	Lowest Energy	-238.2

29	8	Center	-207.5
29	8	Lowest Energy	-227.1

MATERIAL SUPLEMENTAR S9

A análise do poder estatístico foi feita através do *software* G*Power (versão 3.1.9.7), com adaptações baseadas em estudos anteriores (KANG et al., 2021; DRIGO, 2021; HAIR et al., 2016).

Em relação aos dados submetidos a ANOVA de uma via com o experimento de ICC com alvo molecular Gal-4, inicialmente os valores obtidos foram submetidos a Estatística Descritiva no Graphpad Prism (Tabela 19).

Tabela 19 – Estatística Descritiva fornecida pelo Graphpad Prism do experimento de ICC com alvo molecular Gal-4

Grupo	n	SD (s)	x
Controle	110	15,94	99,95
MUS	86	21,56	105,3
PTX	97	44,85	107,1
APV	91	27,14	123,5
ET	106	18,68	122,3

Legenda: n = Número de células em cada grupo; SD = Desvio Padrão; s^2 = Variância; x = Média de cada grupo

Posteriormente, foi calculado o Desvio Padrão Comum (SD, do inglês *pooled standard deviation*) de acordo com a seguinte fórmula clássica, adaptada de Kang et al., (2021):

$$SD_{\text{amostragem}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (n_i - 1) \cdot s_i^2}{\sum_{i=1}^k (n_i - 1)}}$$

Sendo Σ = somatório; k = número de grupos; n= número de células em cada grupo; s = desvio padrão comum; s^2 = variância.

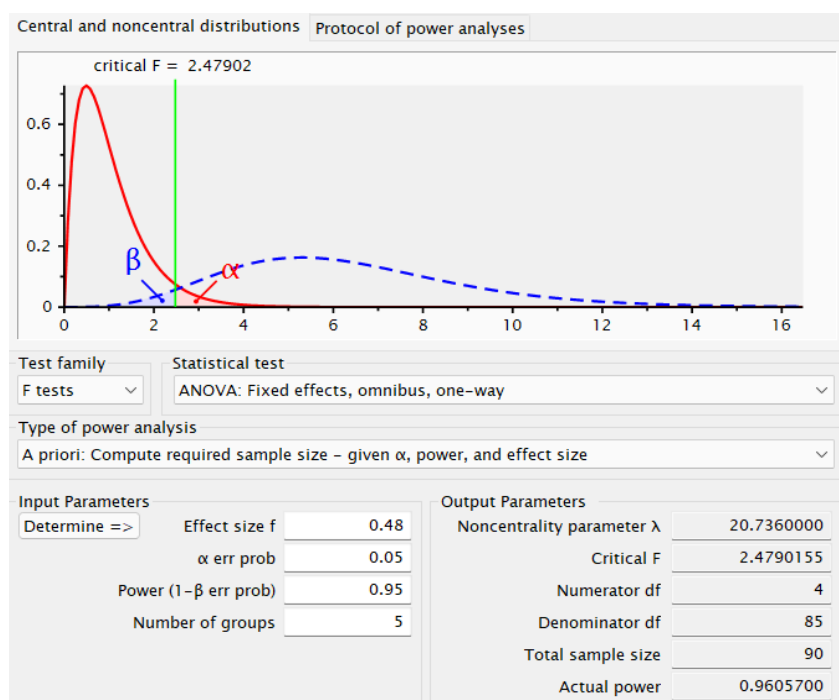
O Desvio Padrão Comum calculado foi de 27,39. Posteriormente, calculou-se o valor do tamanho de efeito “f” a partir da seguinte fórmula:

$$f = \frac{\sigma_m}{\sigma} \quad \sigma_m = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x}_i - \bar{x}_{\text{geral}})^2}{k}}$$

Sendo σ_m = desvio padrão das médias dos grupos; σ = desvio padrão comum; k = número de grupos; \bar{x} = média de cada grupo.

O tamanho do efeito f apresenta 3 níveis: pequeno = 0.10, representa 10% da variância da variável dependente; médio = 0.25, representa 25% da variância da variável dependente; e grande = 0.40, representa 40% da variância da variável dependente. Esse cálculo resultou em um valor de $f = 0,48$, indicando um efeito de magnitude grande de acordo com os critérios de Cohen (COHEN, 2013). No *software* G*Power (versão 3.1.9.7), considerou-se $f = 0,48$, probabilidade de erro do nível de significância $\alpha = 0,05$, o Power ($1 - \beta$ err prob) = 0.95 e número de grupos = 5, o que resultou num poder estatístico de 96% (Power ($1 - \beta$ err prob) = 0.9605700). Na Figura 29 é possível observar a tela do *Software* G*Power com o cálculo do tamanho da amostra.

Figura 29 – Tela do *Software* G*Power com o cálculo do tamanho da amostra no experimento de ICC com alvo molecular Gal-4



Os dados do experimento de ICC com alvo molecular pCREB submetido a ANOVA de uma via, foram submetidos a Estatística Descritiva no Graphpad Prism (Tabela 20).

Tabela 20 – Estatística Descritiva fornecida pelo Graphpad Prism do experimento de ICC com alvo molecular pCREB

Grupo	n	SD (s)	s ²	x
Controle	150	17,48	150	99,97
M	93	19,24	93	98,53
P	133	24,32	133	121,50
Controle + AG4	78	17,85	78	100,00
M + AG4	116	34,63	116	97,81
P + AG4	126	32,29	126	103,90

Legenda: n = Número de células em cada grupo; SD = Desvio Padrão; s² = Variância; x = Média de cada grupo

Posteriormente, calculou-se o SD de 25,55 e valor f de 3,97, com base nas fórmulas descritas anteriormente. O tamanho do efeito f apresenta 3 níveis: pequeno = 0.10, representa 10% da variância da variável dependente; médio = 0.25, representa 25% da variância da variável dependente; e grande = 0.40, representa 40% da variância da variável dependente. Esse cálculo resultou em um valor de $f = 3,97$, indicando um efeito de magnitude grande que extrapola valores descritos na literatura (COHEN, 1988). No *software* G*Power (versão 3.1.9.7), considerou-se $f = 3,97$, probabilidade de erro do nível de significância $\alpha = 0,05$, o Power ($1 - \beta$ err prob) = 0.95 e número de grupos = 6, o que resultou em poder estatístico de 99% (Power ($1 - \beta$ err prob) = 0.9997030). Na Figura 30 é possível observar a tela do Software G*Power com o cálculo do tamanho da amostra.

Figura 30 – Tela do Software G*Power com o cálculo do tamanho da amostra no experimento de ICC com alvo molecular pCREB

